

U. PORTO



FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO
UNIVERSIDADE DO PORTO

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES TRATAMENTOS DE
DESINFECÇÃO DE ALFACE: UMA ABORDAGEM QUÍMICA E
TOXICOLÓGICA**

Elisa Alexandra Mota Ferreira

MAC - Mestrado em Alimentação Colectiva

2009

“Avaliação de diferentes tratamentos de desinfeção de alface: uma abordagem química e toxicológica”

“Evaluation of different disinfecting treatments of lettuce: a chemical and toxicological approach”

Orientadoras:

Prof.^a Doutora Conceição Calhau - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Prof.^a Doutora Valentina Domingues – GRAQ/Instituto Superior de Engenharia do Porto

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Alimentação Colectiva apresentada à Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto.

FCNAUP/GRAQ-ISEP

2009

Agradecimentos

Antes de mais gostaria de agradecer às minhas orientadoras de mestrado, na pessoa da Prof.^a Doutora Conceição Calhau e da Prof.^a Doutora Valentina Domingues, a total disponibilidade e o companheirismo ao longo de todas as fases do trabalho! Não posso deixar ainda de agradecer toda a atenção e disponibilidade cedida pela Prof.^a Doutora Cristina Matos, coordenadora científica do Grupo de Reacção de Análises Químicas (GRAQ), por ter tornado possível a realização experimental de todo este trabalho.

A todos os colegas de trabalho da empresa de restauração colectiva *ICA - Indústria e Comércio Alimentar, S.A*, o entusiasmo, a preocupação e a facilidade do tempo para as aulas presenciais do mestrado em Alimentação Colectiva. Um agradecimento especial ao Exmo. Sr. Álvaro Maia.

À empresa *Ecolab, S.A*, na pessoa do Sr. José Ramos, o meu muito obrigada pelo fornecimento dos produtos desinfectantes testados assim como pelas respectivas fichas técnicas e de segurança.

Às amigas e aos amigos, o apoio incondicional, o companheirismo, a força e a simples amizade nos momentos mais difíceis e ao longo de tantos anos! Às novas amigas do GRAQ!

À minha família que eu tanto estimo e adoro... em especial à minha mãe, ao meu pai e aos meus irmãos.

Resumo

O consumo de hortofrutícolas constitui um pilar fundamental na prática de uma alimentação equilibrada, contribuindo para um estilo de vida saudável. A contaminação natural destes alimentos e o facto de serem consumidos em cru (e serem produzidos no solo, meio contaminado por natureza) eleva a necessidade de atender às diferentes etapas do processamento, especialmente a etapa da desinfecção, uma vez que esta é responsável por assegurar a segurança alimentar destes géneros alimentares.

Foi objectivo do presente trabalho avaliar a formação de clorofórmio, enquanto subproduto da desinfecção, após a utilização de diferentes desinfectantes, em alface pronta para consumo, nomeadamente, vinagre de vinho, hipoclorito de sódio (lixívia), dicloroisocianurato de sódio (pastilha de cloro) e ácido peracético.

Foi utilizada a técnica de microextração em fase sólida em *headspace*, seguida de cromatografia gasosa com detecção por captura de electrões, para a análise de clorofórmio. Este método foi caracterizado em termos de linearidade e limites de detecção para cada uma das fibras utilizadas (100 μm PDMS e 65 μm PDMS/DVB), assim como as condições de optimização, no que diz respeito à concentração de NaCl e ao tempo da fibra em exposição.

A desinfecção com pastilha de cloro foi aquela que originou uma maior formação de clorofórmio, seguida da solução de hipoclorito de sódio, após a imersão de alface nas soluções desinfectantes, durante 15 e 60 minutos. Pelo

contrário, o vinagre e o ácido peracético foram aquelas que evitaram a maior formação deste composto orgânico volátil.

A etapa da desinfecção química de hortofrutícolas não é de todo linear pelo que inúmeros factores são influenciadores da capacidade antimicrobiana destes produtos. Para além disso, a utilização dos produtos de desinfecção deve ser revista a fim de considerar não apenas a segurança microbiológica do produto, mas também, e não menos importante, a segurança química dos hortofrutícolas após a desinfecção. Para além disso, a exposição diária pelos trabalhadores das empresas utilizadoras deste tipo de desinfectantes deve, também, ser estudada dada a reconhecida toxicidade do clorofórmio, uma vez que estes manipuladores estão expostos a níveis no ar ambiente maiores do que população geral.

Estes resultados sugerem a necessidade de abordar a segurança química dos produtos de desinfecção utilizados em contacto com legumes.

Palavras-Chave: desinfecção química, clorofórmio, cromatografia gasosa, alface, SPME, toxicidade.

Abstract

The consumption of vegetables is a cornerstone in the practice of a balanced diet, contributing to a healthy lifestyle. The contamination of these natural foods that are consumed raw (ready-to-eat foods) increases the need to address the different stages of processing, especially the step of disinfection, since it is responsible for ensuring the food safety of this product.

The objective of this study was to evaluate the formation of chloroform as a byproduct of the disinfection, after the use of various products for disinfection of lettuce. For the analysis of this compound, we used the technique of solid-phase microextraction (SPME) in headspace, followed by gas chromatography with electron-capture detection. The HS-SPME-GC-ECD method for each fiber was characterized in terms of linearity and detection limits (LOD). In extraction optimization parameters, the addition of salt and extraction time was evaluated. The optimization of SPME conditions for two different fibers polydimethylsiloxane (PDMS-100 μm) and polydimethylsiloxane-divinylbenzene (PDMS/DVB-65 μm) by headspace (HS) was performed in this work.

Disinfection with chlorine tablets was the one that led to an increased formation of chloroform, followed by the solution of sodium hypochlorite, after an immersion of lettuce in the solution during 15 and 60 minutes. On the other hand, vinegar and peracetic acid were those who avoided the formation of more volatile organic compound analysis. The step of the chemical disinfection of fruit and vegetables is not completely linear and many factors are influencing the ability of antimicrobial products. In addition, the use of disinfectants should be revised to

consider not only the microbiological safety of the product, but not least the chemical safety of horticultural products after disinfection. Beside this, the daily exposure by employees of companies using such disinfectants should also be studied, since these handlers are exposed to chloroform in the ambient air greater than the general population.

These results suggested the need to address the chemical safety of the disinfection products used in contact with vegetables.

Key words: chemical disinfection, chloroform, gas chromatography, lettuce, SPME, toxicity

Índice

Lista de Abreviaturas.....	xiii
Lista de Figuras.....	xv
Lista de Tabelas.....	xvii
1. Introdução.....	1
2. Objectivos.....	13
2.1. Objectivos específicos.....	13
3. Material e Métodos.....	15
3.1. Técnica analítica utilizada.....	15
3.2. Reagentes e consumíveis.....	17
3.3. Preparação de soluções.....	19
3.4. Equipamentos.....	20
3.5. Preparação da amostra.....	21
3.6. Metodologia analítica.....	22
3.7. Análise cromatográfica.....	23
4. Resultados e Discussão.....	27
4.1. Ensaio preliminares.....	29
4.2. Optimização do método.....	30
4.3. Validação do método analítico de determinação do clorofórmio.....	36
4.4. Influência da matéria orgânica na formação de clorofórmio.....	40
4.5. Determinação da formação de clorofórmio após a utilização dos produtos de desinfeção testados.....	43
5. Conclusão.....	55
6. Referências Bibliográficas.....	57
7. Anexos.....	61

Anexo A – Descrição da eficácia antimicrobiana de diferentes desinfectantes químicos.....	a1
1. Cloro (Hipoclorito).....	a1
2. Dióxido de cloro e clorito de sódio acidificado.....	a5
3. Ozono.....	a8
4. Compostos ácidos.....	a9
5. Ácido peracético.....	a12
6. Peróxido de hidrogénio.....	a13
Anexo B – Concentrações de clorofórmio utilizadas na construção das rectas de calibração e respectivos resultados.....	a15
Anexo C - Fichas técnicas e de segurança dos produtos de desinfeção.....	a17
1. P3 – tsunami 100 [®] (ácido peracético)	a17
2. Sanichlor [®] (pastilhas de cloro efervescentes)	a29
3. Mikrochlor liquid [®] (lixívia)	a39

Lista de Abreviaturas

Sigla	Significado
AP	Ácido peracético ou peroxiacético
CG	Cromatografia gasosa/Cromatógrafo gasoso
COV	Composto orgânico volátil
CV	Coeficiente de variação
ECD	Detector de Captura de Electrões (do inglês: <i>Electron capture detector</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GRAQ	Grupo de Reacções e Análises Químicas
GRAS	Geralmente Reconhecido Como Seguro (do inglês: <i>Generally Recognized As Safe</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês: <i>High performance liquid chromatography</i>)
HS	<i>Headspace</i>
HS-SPME	Microextração em fase sólida (do inglês: <i>Solid-Phase MicroExtraction</i>) com <i>headspace</i>
IARC	Agência Internacional para a Pesquisa do Cancro (do inglês: <i>International Agency for Research on Cancer</i>)
LOD	Limite de detecção
NIOSH	Instituto <i>Nacional para a Segurança e a Saúde</i> Ocupacionais (do inglês: <i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>)
OMS	Organização Mundial da Saúde (do inglês: <i>World Health Organization</i>)
OSHA	Administração da Segurança e da Saúde Ocupacionais (do inglês: <i>Occupational Safety and Health Administration</i>)

PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
PEL	Limite de exposição permissível (do inglês: <i>Permissible Exposure Limit</i>)
R ²	Coefficiente de correlação
REL	Limite de exposição recomendado (do inglês: <i>Recommended Exposure Limit</i>)
RSD	Desvio padrão relativo (do inglês: <i>Relative Standard Deviation</i>)
sd	Desvio padrão
SPD	Subprodutos da desinfecção
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês: <i>Solid-Phase MicroExtraction</i>)
TAM	Trihalometanos
TAMt	Trihalometanos totais
UFC	Unidades formadoras de colónias

Lista de Figuras

Figura 1 – Mecanismos pelos quais os hortofrutícolas podem ficar contaminados com microrganismos patogénicos (Adaptado de Beuchat, 1998).	3
Figura 2 - Esquema de microextração em fase sólida em interface com a cromatografia gasosa (Adaptado de Supelco, 2008).	16
Figura 3 – Fibra de SPME com suporte manual.....	17
Figura 4 - Equipamento de cromatografia gasosa com detector de captura de electrões.....	20
Figura 5 – Extração de clorofórmio com fibra de 65 µm PDMS/DVB em <i>headspace</i>	21
Figura 6 – Alface macerada utilizada nos ensaios com os produtos desinfectantes.	22
Figura 7 – Viais de 20 mL utilizados.....	22
Figura 8 - Cromatograma da análise de trialometas em água da rede pública.	30
Figura 9 - Resultados da área obtida referente à extração de clorofórmio nos dois tipos de tratamento da alface (PDMS).	31
Figura 10 - Extração de clorofórmio de acordo com a quantidade de NaCl adicionada com a fibra PDMS.	32
Figura 11 - Extração de clorofórmio de acordo com a quantidade de NaCl adicionada com a fibra PDMS/DVB.....	33
Figura 12 - Extração de clorofórmio ao longo do tempo com a fibra PDMS.	35
Figura 13 - Extração de clorofórmio ao longo do tempo com a fibra PDMS/DVB.	35

Figura 14 - Recta de calibração de clorofórmio para extracção por SPME-HS-ECD com a fibra PDMS.	37
Figura 15 - Recta de calibração de clorofórmio para extracção por SPME-HS-ECD com a fibra PDMS/DVB.	38
Figura 16 - Recta de calibração de clorofórmio para extracção por SPME-HS-ECD com a fibra PDMS/DVB obtida na segunda fase.	39
Figura 17 - Avaliação da adição de sacarose na extracção de clorofórmio nas soluções desinfectantes de ácido peracético (AP) e dicloroisocianurato de sódio (NaDCC), utilizando a fibra PDMS/DVB.	41
Figura 18 - Estrutura química do clorofórmio.	43
Figura 19 – Avaliação do tempo de imersão na formação de CHCl_3 de acordo com o tipo de desinfectante utilizado (PDMS/DVB).	49

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Perigos físicos, químicos e biológicos associados aos hortofrutícolas..	7
Tabela 2 - Vantagens e limitações de métodos de desinfecção de vegetais.	10
Tabela 3 - Quadro resumo das características dos produtos químicos de desinfecção utilizados.	18
Tabela 4 - Condições de operação do equipamento de cromatografia gasosa. ..	24
Tabela 5 – Tabela resumo das variáveis escolhidas para a execução dos ensaios.	36
Tabela 6 – Resultados obtidos após os ensaios em triplicado referentes à repetibilidade do método (PDMS/DVB).	40
Tabela 7 – Resultados obtidos na análise das soluções desinfectantes após 15 e 60 minutos em agitação.	50
Tabela 8 – Concentrações de clorofórmio utilizadas nas rectas de calibração, limite de detecção e coeficiente de correlação, respectivos.	a15

1. Introdução

O consumo de hortofrutícolas constitui um pilar fundamental na prática de uma alimentação equilibrada, contribuindo para um estilo de vida saudável. Os hortofrutícolas são uma importante fonte de micronutrientes, de fibras e de muitos outros componentes com propriedades funcionais ⁽¹⁾. Para além disso, as frutas e os hortícolas têm uma baixa densidade energética, isto é, poucas calorias em relação ao volume do alimento consumido, o que favorece a saudável manutenção do peso corporal ⁽²⁾. Segundo dados do Relatório Mundial da Saúde (World Health Report, 2002) ⁽³⁾, a alimentação constitui directa ou indirectamente o principal factor de risco de patologias crónicas como cancro, doenças cardiovasculares, diabetes e osteoporose, para além de que a actual evidência científica disponível oferece uma forte correlação do papel da alimentação na prevenção e no controlo da morbilidade atribuída às doenças crónicas não transmissíveis ^(3, 4). Por esta razão, a *Estratégia Global sobre Dieta, Actividade Física e Saúde*, elaborada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), alerta para o aumento do consumo de frutas e hortícolas nas recomendações elaboradas para a prevenção de doenças crónicas ⁽⁵⁾.

A nível nacional, a Nova Roda dos Alimentos recomenda o consumo diário de três a cinco porções de fruta e de três a cinco porções de hortícolas (6 a 10 de hortofrutícolas), enfatizando a importância de variar o consumo desses alimentos de forma a serem regularmente substituídos, assegurando a variedade alimentar e nutricional dentro de cada grupo ⁽⁶⁾.

Ao longo das últimas décadas os consumidores tornaram-se mais conscientes e atentos acerca da estreita correlação entre Alimentação e Saúde. Este facto, em combinação com um estilo de vida exigente resultou num aumento da procura de produtos frescos, saudáveis, disponíveis e de fácil utilização, como, por exemplo, os produtos hortícolas minimamente processados ⁽⁷⁾. Desta forma, e indo ao encontro das necessidades/requisitos dos seus utentes e clientes, para além da Indústria Alimentar, também as empresas de Restauração Colectiva estão atentas de forma a providenciarem cada vez mais alternativas dentro do grupo dos hortofrutícolas.

O solo, ambiente natural dos hortofrutícolas, é por natureza um meio ambiente contaminado pelo que, após colheita, estes alimentos apresentam uma série de microrganismos patogénicos capazes de causar doenças humanas. No entanto, a contaminação destes produtos pode, também, ocorrer durante a colheita, o transporte, a transformação, a distribuição e a comercialização ⁽⁸⁻¹¹⁾. Bactérias tais como *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, habitantes normais de muitos solos, e *Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia coli* e *Campylobacter*, que podem residir no tracto intestinal dos animais, incluindo os seres humanos, são mais susceptíveis de poderem contaminar frutas e hortícolas crus através de contacto com fezes, água de esgoto ou de irrigação não tratada. O mesmo se poderá verificar com os vírus e os parasitas. A contaminação pode, então, verificar-se durante o tratamento pós-colheita, incluindo em pontos de preparação, por vendedores ambulantes, de produtos alimentares em estabelecimentos de serviço e em casa ⁽¹²⁾. Sabe-se também que geralmente, quanto mais cedo ocorrer a contaminação, mais difícil

se torna a sua desinfecção pelo que a sua segurança poderá ficar comprometida (9, 12).

A Figura 1 mostra alguns potenciais mecanismos através dos quais os microrganismos patogénicos podem contaminar os produtos hortofrutícolas.

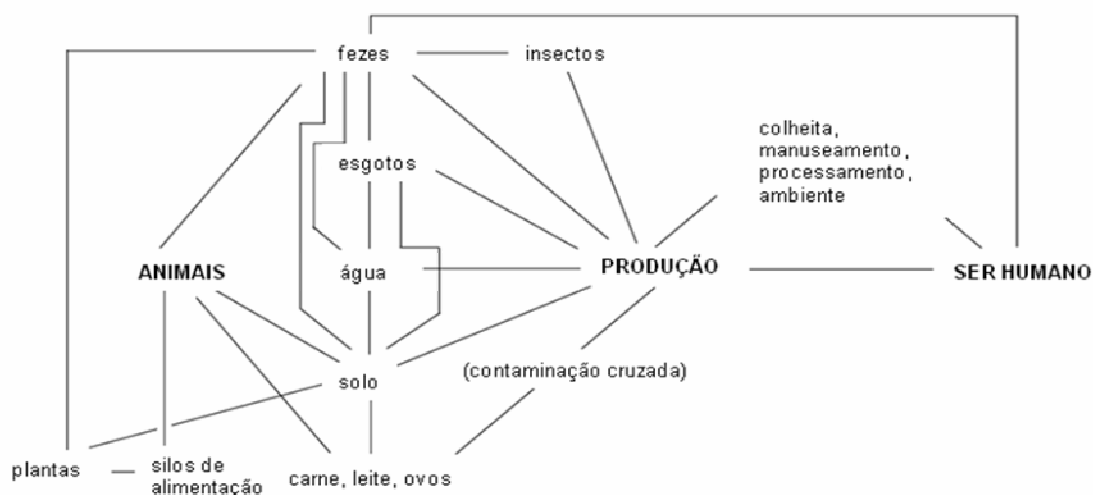


Figura 1 – Mecanismos pelos quais os hortofrutícolas podem ficar contaminados com microrganismos patogénicos (Adaptado de Beuchat, 1998).

Os produtos hortícolas consumidos em cru, reconhecidos veículos de doenças humanas são responsáveis por surtos de toxinfecção alimentar, pelo menos, há já um século. Mais recentemente tem-se observado um aumento do número de casos relatados com o consumo de frutas e de hortícolas, também como resultado da mudança dos hábitos (maior consumo de refeições fora de casa, etc.) e do aumento da importação e da globalização do fornecimento deste grupo de alimentos (9, 12, 13). A susceptibilidade dos indivíduos às toxinfecções alimentares, nomeadamente nos países mais desenvolvidos, tem-se alterado devido ao aumento do número de pessoas idosas, imunocomprometidas ou que apresentam doenças crónicas. Esta mudança na demografia social é susceptível

de conduzir a um risco aumentado de doença associada ao consumo do produto em cru que, caso contrário, podem conter níveis de microrganismos patogénicos inócuos para os indivíduos saudáveis ⁽¹²⁾.

Os surtos alimentares têm sido atribuídos a sementes germinadas, vegetais folhosos, como é o exemplo da alface (*Lactuca sativa* L), tomate e melão. Os microrganismos associados a estes surtos têm sido a *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica*, *Cyclospora cayetanensis*, vírus da Hepatite A, entre outros ⁽⁹⁾, em saladas prontas a consumir ^(11, 14, 15) e servidas em restaurantes de *fast-food*, nomeadamente nos restaurantes de “*Kebab*” ⁽¹⁶⁾. Os *Kebabs* são geralmente servidos com uma salada composta por alface, tomate, cebola, pepino e repolho. Nos últimos anos observaram-se surtos de toxinfecção alimentar associados não só aos *kebabs* como, também, a produtos servidos em restaurantes de *take-away*. Entre 1992 e 2007, treze desses surtos foram relatados na Inglaterra e no País de Gales, onze dos quais foram causados por *Salmonella*, um pela *Escherichia coli* O157:H7 e outro pelo *Campylobacter* ⁽¹⁶⁾.

Uma vez que se trata de géneros alimentares que em grande parte são consumidos no estado natural, ou seja, em cru, as etapas da lavagem e da desinfecção são aquelas que podem auxiliar na remoção e/ou eliminação de parte da carga microbiana destes alimentos evitando, desta forma, os surtos de toxinfecção alimentar. No entanto, note-se que é improvável que a lavagem e a desinfecção eliminem totalmente todos os agentes patogénicos após o produto estar contaminado. Desta forma, é fundamental o uso de protocolos de lavagem e de desinfecção que sejam eficientes. Apesar da variedade de métodos existentes, cada método possui as suas vantagens e desvantagens, dependendo de uma

série de factores e variáveis envolvidas no processo e que serão descritas ao longo do presente trabalho.

De acordo com a *Food and Drug Administration* (FDA), uma definição para “desinfecção” aplicada a alimentos como frutas e hortaliças frescas traduz-se pelo tratamento do produto limpo por um processo eficaz em destruir ou reduzir o número dos microrganismos patogénicos, sem afectar a qualidade ou segurança do produto para o consumidor ⁽¹⁷⁾. Esta definição contempla a necessidade de manter a produção de qualidade, reforçando simultaneamente a segurança, reduzindo as populações de microrganismos patogénicos de importância para a saúde pública que poderão, teoricamente, existir neste género de produtos alimentares ⁽¹⁸⁾. Por outro lado, de acordo com o *Codex of Hygienic Practice for Precooked and Cooked Food in Mass Catering*, as frutas e os hortícolas para consumir em cru e para serem utilizados nas refeições devem ser bem lavados em água potável antes de serem adicionados às refeições, não fazendo referência à etapa da desinfecção ⁽¹⁹⁾.

No entanto, a escolha do desinfectante ideal deverá basear-se naquele que conseguir garantir a destruição total dos microrganismos patogénicos e a diminuição dos não patogénicos a uma quantidade que não possa influenciar de maneira prejudicial a qualidade e as características dos produtos, assim como a segurança do consumidor ⁽¹⁸⁾.

A relação entre as bactérias patogénicas para os seres humanos e a microflora nativa dos produtos alimentares, incluindo os organismos de deterioração pós-colheita, é de grande interesse pelo menos por duas razões: (1), tem sido sugerido que o facto de reduzir ou controlar as populações nativas microbianas através da lavagem ou desinfecção ou do armazenamento em

atmosfera controlada pode permitir que as bactérias patogénicas se desenvolvam em maior número, uma vez que não existe competição por espaço ou nutrientes, nas superfícies dos alimentos ⁽²⁰⁾, em teoria, este cenário pode resultar num produto que não está deteriorado, mas que não é seguro para consumo; (2) a proliferação de organismos deterioradores pós-colheita pode comprometer a integridade da casca e alterar o pH do produto, aumentando assim a sobrevivência e o crescimento de bactérias patogénicas para o Homem ⁽¹⁸⁾.

Desta forma, as etapas do processamento que originam a contaminação dos produtos (ex: colheita, armazenamento, etc.) são um factor limitador e a ter em conta para a actuação dos desinfectantes, assim, como o período decorrido entre a contaminação e a desinfecção, a localização das bactérias no produto (superfície lisa, rugosa, fendas, ranhuras), o tipo de alimento, a existência de biofilmes, a composição da microflora, a quantidade de matéria orgânica, a temperatura e o tempo de contacto do desinfectante, entre outros factores ^(9, 21, 22). Por conseguinte, recomenda-se que a prevenção e o controlo dos perigos associados à segurança alimentar dos hortofrutícolas deva ser tomada em consideração durante toda a cadeia alimentar, nomeadamente desde o “campo ao prato”, para reduzir e /ou evitar a sua contaminação durante as diferentes etapas da produção e do processamento, finalizando na distribuição ⁽¹⁸⁾. A aplicação de Boas Práticas de Higiene durante as diferentes fases do processamento, combinadas com o sistema de Análise de Perigos e Controlo dos Pontos Críticos, irá certamente minimizar a contaminação destes produtos e reduzir o risco de doença associada ao seu consumo ⁽¹²⁾.

Garantir a segurança alimentar ao consumidor significa fornecer produtos isentos de perigos, ou seja, livres de contaminação física, química e biológica,

que podem causar efeitos adversos à saúde. A Tabela 1 apresenta um breve resumo de alguns dos diferentes perigos associados aos hortofrutícolas, referindo como exemplos de perigos físicos os fragmentos de metais provenientes de equipamentos; os subprodutos da desinfecção química ou resíduos de pesticidas apresentam-se como perigos químicos; e os perigos biológicos podem revelar-se nas bactérias patogénicas ⁽¹²⁾.

Tabela 1 - Perigos físicos, químicos e biológicos associados aos hortofrutícolas.

TIPO DE PERIGO	EXEMPLO
Físico	Metais, vidro, plástico, madeira, objectos pessoais, peças de equipamento
Químico	Pesticidas, subprodutos da desinfecção, resíduos químicos, micotoxinas, alcalóides, alérgenos, inibidores de enzima
Biológico	Fungos, leveduras, vírus, protozoários, bactérias, algas

Tal como se observa na Tabela 1, o perigo químico dos produtos hortofrutícolas podem traduzir-se na presença de pesticidas ⁽²³⁾ ou de produtos químicos resultantes das etapas de processamento destes géneros alimentares, nomeadamente através da etapa da desinfecção ^(8, 14). Esta etapa constitui um passo essencial na eliminação dos perigos biológicos. Em contrapartida esta mesma etapa pode dar origem aos mencionados perigos químicos, que não podem ser negligenciados no que diz respeito à saúde dos consumidores e dos manipuladores de alimentos, como é o caso dos compostos da classe dos trihalometanos (TAM) ⁽⁸⁾.

A etapa da desinfecção é a fase mais importante no processamento de produtos hortícolas para consumir em cru, uma vez que estes alimentos devem

estar livres de patogénios aquando do consumo. Esta etapa deve, então, ser abordada de vários ângulos de forma a abranger todos os assuntos relacionados, nomeadamente a escolha do desinfectante, a sua eficácia a nível microbiológico, a facilidade de manuseamento, a formação aos manipuladores, etc., visto que o uso destes produtos poderá reduzir significativamente a contaminação. Zhang e Farber (1996) ⁽²⁴⁾, verificaram que se trata de uma etapa do processamento que não é linear no seu processo, existindo vários factores influenciadores da acção bactericida do desinfectante utilizado. Estes autores demonstraram que o tempo de contacto, o tipo de vegetal que se desinfecta, a temperatura, o cloro livre e o próprio tipo de desinfectante conduzem a resultados diferentes quando os produtos são analisados do ponto de vista microbiológico, mais concretamente, a nível da presença de *Listeria monocytogenes*. No caso da desinfectação de alface, os mesmos autores constataram que a eficácia do cloro era superior à temperatura de 22°C, quando comparada com 4°C, no entanto, na desinfectação de repolho, não se observou quase nenhuma diferença na inactivação da *L. monocytogenes* nas duas temperaturas testadas ⁽²⁴⁾.

Os desinfectantes utilizados na Indústria Alimentar poderão apresentar características diferentes dos produtos utilizados na Restauração Colectiva e/ou Pública, uma vez que os equipamentos utilizados e as suas dimensões obrigam à implementação de tecnologias direccionadas, quer para esses equipamentos, quer para o tipo de alimentos que são manuseados. Desta forma, os desinfectantes que exigem a sua formação no local, não poderão ser considerados para serem utilizados nas unidades de restauração, sem antes serem apreciadas todas as condições de segurança exigidas pelo seu uso.

De facto, a desinfecção química com produtos à base de cloro é actualmente a única barreira existente e colocada em prática nos diversos estabelecimentos de restauração colectiva nacionais, sendo utilizada pelas cinco maiores empresas de restauração colectiva nacionais (*Indústria e Comércio Alimentar, S.A; Eurest Portugal – Sociedade Europeia de Restaurantes, L.^{da}; Uniself - Sociedade de Restaurantes Públicos e Privados S.A; Itau – Instituto Técnico de Alimentação Humana e Gertal - Companhia Geral de Restaurantes e Alimentação, S.A*) para a prevenção da transmissão de doenças de origem alimentar transmitidas pelos alimentos consumidos em cru.

Como já foi referido, a eficácia do uso de desinfectantes químicos na superfície de frutas e hortícolas pode não eliminar de forma completa os microrganismos patogénicos, sendo limitada e imprevisível, por isso. Nesta fase é fundamental a escolha adequada do desinfectante, pois além de eficaz não pode ser tóxico ⁽¹⁵⁾. Apesar de actualmente, os produtos à base de cloro continuarem a ser os mais utilizados, os ácidos orgânicos (como é o exemplo do ácido láctico ou ácido acético) e o ácido peracético, têm vindo a ganhar aceitação no mercado mundial. Para além disso, têm sido cada vez mais apresentados como uma alternativa segura à utilização dos compostos à base de cloro, sendo também amplamente utilizados por serem considerados tão ou mais eficazes do que esses compostos ⁽¹⁴⁾.

De seguida, é apresentado uma tabela resumo com algumas vantagens e limitações de produtos químicos utilizados na desinfecção de produtos hortícolas (Tabela 2).

Tabela 2 - Vantagens e limitações de métodos de desinfecção de vegetais.

Desinfetante	Vantagens	Limitações ou desvantagens
Cloro (hipoclorito de sódio)	<ul style="list-style-type: none"> . Baixo custo . Fácil manuseamento e aquisição 	<ul style="list-style-type: none"> . Formação de subprodutos da desinfecção (SPD) perigosos em níveis elevados . Reagem com a matéria orgânica . A eficácia é afectada pela presença de matéria orgânica . Corrosivo . Actividade dependente do pH
Dióxido de cloro	<ul style="list-style-type: none"> . Maior eficácia antimicrobiana a pH neutro do que o cloro . Eficácia menos dependente do pH do que o cloro . Potencialmente menor formação de SPD do que o cloro . Menos corrosivo do que o cloro e o ozono 	<ul style="list-style-type: none"> . Não é eficiente nos níveis permitidos para os produtos frescos . Exige formação no local . Explosivo . Permitido para os produtos inteiros . É necessária água de lavagem após o tratamento . Formação de subprodutos específicos (clorito e clorato) . Exige um acompanhamento em aplicações interiores
Ozono	<ul style="list-style-type: none"> . Elevada actividade antimicrobiana . Reduzido tempo de contacto . Substância Geralmente Reconhecida Como Segura (GRAS) . Sem problemas de resíduos . Sem formação de SPD perigosos . Menor custo de funcionamento 	<ul style="list-style-type: none"> . Exige formação no local . Tóxico se inalado . Exige um acompanhamento em aplicações interiores . Corrosivo em concentrações superiores a 4 ppm . Maior custo de investimento inicial
Ácidos orgânicos	<ul style="list-style-type: none"> . Fácil manuseamento . Sem toxicidade 	<ul style="list-style-type: none"> . Longo tempo de contacto, não é relevante para a Indústria . Interfere com a qualidade sensorial dos produtos . Relativa menor eficácia antimicrobiana
Ácido peracético	<ul style="list-style-type: none"> . Eficácia não é afectada pela carga orgânica da água nem pelas oscilações de temperatura . Sem formação de SPD perigosos . Não é corrosivo nos níveis autorizados (80 ppm) 	<ul style="list-style-type: none"> . Baixa eficácia nos níveis autorizados na desinfecção de vegetais
Peróxido de hidrogénio	<ul style="list-style-type: none"> . Sem problemas de resíduos . Fácil de usar . Baixo custo 	<ul style="list-style-type: none"> . Baixa eficácia antimicrobiana . Longo período de contacto . Exige a remoção de H₂O₂ residual após o processamento

Adaptado de Olmez e Kretschmar, 2009.

Apesar das inúmeras vantagens da desinfecção, uma das limitações ou desvantagem desta etapa do processamento são as perdas nutricionais nos alimentos após a desinfecção química. Os resultados indicam que uma desinfecção comum pode resultar em perdas de fortes anti-oxidantes presentes nos hortícolas e que são essenciais à saúde humana. Por exemplo, de acordo com a literatura ⁽²⁵⁾, cerca de 70% dos tióis foram perdidos quando o espinafre foi tratado com peróxido de hidrogénio durante 30 minutos. Para além disso, entre 48 a 54% de tióis foram destruídos pelo cloro livre após condições normais de contacto. Em pimentos vermelhos, aproximadamente 60^a a 71% da glutathiona é oxidada pelos desinfectantes. As perdas dos tióis estão dependentes do tipo deste composto, do tipo de desinfectante utilizado assim como do tipo de vegetal ⁽²⁵⁾.

Os compostos clorados são germicidas de grande acção, uma vez que reagem com as proteínas das células microbianas promovendo a perda de compostos celulares. Para além disto, foi desenvolvido um estudo que avaliou as perdas nutricionais de cenoura desinfectada e onde eram afectados os níveis de açúcares, de caroteno e a sua capacidade antioxidante ⁽²⁶⁾.

Desta forma, considerando a utilização deste género de produtos (pastilhas à base de cloro, hipoclorito de sódio, etc., com o composto activo semelhante ao utilizado na desinfecção da água de consumo) na desinfecção de produtos hortícolas para consumir em cru (alface, tomate, cenoura, etc.), coloca-se a hipótese da formação destes compostos aquando do processo de desinfecção nas unidades de restauração, constituindo desta forma um perigo químico. Apesar da benéfica eliminação dos perigos biológicos, até que ponto a aplicação desta etapa não constituirá a inclusão de perigos químicos até então inexistentes?

Ao longo da preparação do presente trabalho constatou-se que existem mais estudos comparativos entre os diferentes desinfetantes a nível da sua eficácia antimicrobiana do que ao nível da formação de subprodutos da desinfecção pelo que os perigos químicos associados à utilização dos desinfetantes começaram recentemente a suscitar atenção por parte da comunidade científica. Em anexo, são apresentados os resultados de estudos realizados de forma a avaliar a eficácia antimicrobiana de alguns desinfetantes químicos (Anexo A).

Assim, pretende-se com a realização do presente trabalho, avaliar diferentes métodos químicos de desinfecção da alface relativamente à formação de subprodutos da desinfecção, mais concretamente em relação à produção de clorofórmio.

2. Objectivos

O presente trabalho teve como objectivo geral a comparação de diferentes tipos de desinfectantes químicos utilizados na desinfeção de alface, no que diz respeito à formação de clorofórmio.

2.1. Objectivos específicos

- Optimização da técnica de microextração em fase sólida na extração de clorofórmio (SPME-GC-ECD-HS) em soluções desinfectantes de alface.
- Comparação de quatro métodos químicos de desinfeção de hortofrutícolas (vinagre de vinho, hipoclorito de sódio, dicloroisocianurato de sódio, ácido peracético) relativamente à formação do subproduto de desinfeção (clorofórmio) durante a desinfeção de alface.

3. Material e Métodos

O trabalho laboratorial foi realizado no GRAQ - Grupo de Reacção e Análises Químicas - que funciona em instalações do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP) e está integrado no Centro de Química da Universidade do Porto (CEQUP).

3.1. Técnica analítica utilizada

Os comprovados efeitos adversos na saúde humana dos compostos da classe dos trihalometanos (TAM) despoletou o desenvolvimento de métodos analíticos simples, rápidos e confiáveis para a sua determinação ⁽²⁷⁾. Assim, têm sido descritos diferentes métodos para a sua análise, incluindo a recente técnica de microextracção em fase sólida (SPME). Das inúmeras vantagens que possui, o facto de ser uma técnica rápida, sensível, barata, portátil e livre de solventes são talvez as suas características mais fortes ⁽²⁸⁻³⁰⁾. Para além das vantagens referidas, trata-se de uma técnica que também pode ser aplicada em diferentes tipos de matrizes sólidas, líquidas e gasosas ⁽³¹⁾.

A técnica de microextracção é uma técnica simples, sendo baseada na sorção dos compostos para uma fibra de sílica revestida por material polimérico e que, posteriormente, são desorvidos num instrumento analítico ⁽³²⁾. A SPME é uma técnica analítica desenvolvida para amostras de pequeno volume, apresentando, também, uma redução no consumo de solvente e na diminuição do tempo de análise ⁽³³⁾.

É um método de preparação de amostras baseada na adsorção e tem sido amplamente usada para a análise de traços de substâncias, tanto na pré-concentração destes compostos quanto na separação de analitos de uma matriz.

Esta técnica, mais precisamente em *headspace* (HS) tem sido aplicada com sucesso na análise de compostos orgânicos voláteis, nomeadamente, TAM e outros compostos halogenados em diferentes matrizes alimentares como, por exemplo, água da rede, produtos de cacau, café, azeite ^(31, 33-38). Particularmente adequada para determinar compostos voláteis e largamente utilizada nas análises de amostras ambientais ⁽³⁵⁾, a grande vantagem da extração em HS é o facto de a fibra não entrar em contacto directo com a solução, evitando assim contaminações da mesma (Figura 2).

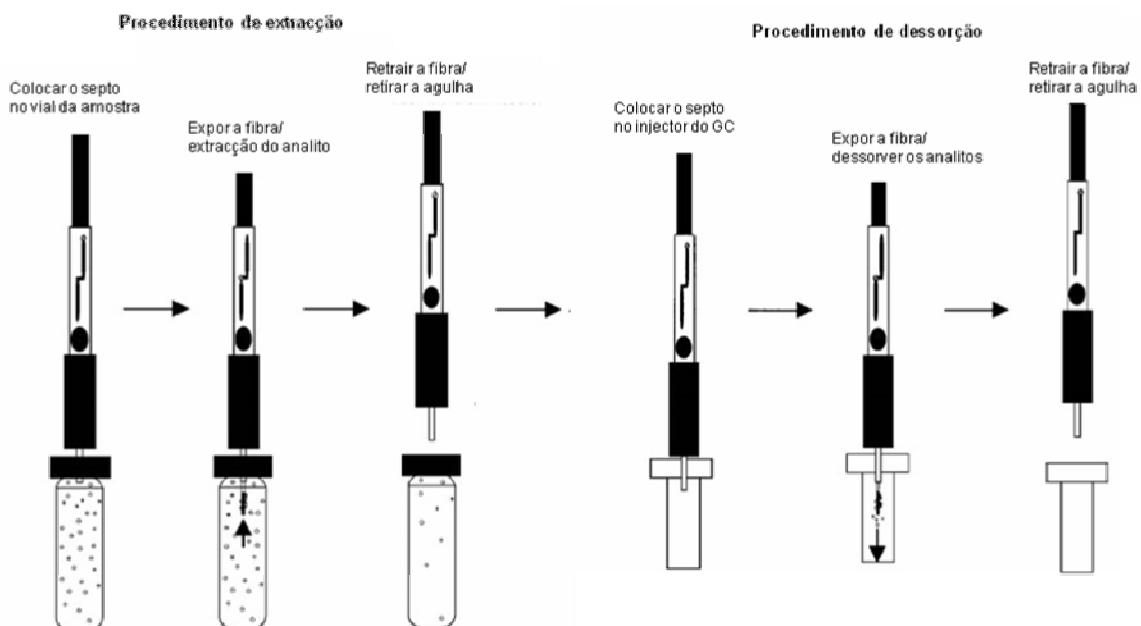


Figura 2 - Esquema de microextração em fase sólida em interface com a cromatografia gasosa (Adaptado de Supelco, 2008).

3.2. Reagentes e consumíveis

O clorofórmio utilizado na elaboração das soluções padrão com 99,99% de pureza foi adquirido à Supelco[®]. Foi ainda usado metanol da *Merck* (*gradient grade* para HPLC) para a preparação destas soluções.

Utilizou-se água desionizada, com 1 μ S/cm de pureza, e água da rede pública.

Foram avaliados quatro tipos de soluções desinfectantes: vinagre de vinho com 6% de acidez, pastilhas efervescentes de cloro activo (diclorosocianurato de sódio), hipoclorito de sódio (vulgarmente conhecido por lixívia) e ácido peracético. Para a titulação da concentração da solução desinfectante de ácido peracético foi utilizado permanganato de potássio, tiosulfato de sódio, ácido sulfúrico e solução de amido a 1%.

Realizaram-se estudos com duas fibras de SPME, uma fibra de 100 μ m de polidimetilsiloxano (PDMS) e uma fibra de 65 μ m de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB). No manuseamento das fibras utilizou-se um suporte (*holder* manual) para segurar ambas as fibras em exposição, ambos adquiridos à Supelco[®] (Figura 4). Os vials de vidro, com capacidade para 20 mL, cujas tampas possuíam um septo de *Teflon*, foram selados com um capsulador.



Figura 3 – Fibra de SPME com suporte manual.

O presente trabalho teve em consideração as recomendações de utilização dos fabricantes dos diferentes tipos de produtos e não a semelhança nas concentrações entre produtos, sendo que as concentrações de cloro obtidas com a utilização dos desinfetantes testados eram por consequência variáveis de acordo com a composição química do produto. Na Tabela 3, é apresentado o resumo de algumas características dos produtos químicos desinfetantes utilizados.

Tabela 3 - Quadro resumo das características dos produtos químicos de desinfecção utilizados.

Nome comum	Nome comercial	Composto activo	Dosagem recomendada	Concentração
Vinagre de vinho	Vinagre de vinho com 6% de acidez (Masterchef®)	Ácido acético	1 dl vinagre/10L água	Solução com 1% de vinagre
Lixívia	Mikrochlor®	Hipoclorito de sódio	3 gotas/litro de água	70 ppm
Pastilhas de cloro	Sanichlor®	Dicloroisocianurato de sódio	1 pastilha/10L	50 ppm
Ácido peracético	P3 - Tsunami 100®	Ácido acético; peróxido de hidrogénio; ácido peracético	Obtida por titulação	80 ppm

3.3. Preparação de soluções

As soluções padrão de clorofórmio foram preparadas por pesagem rigorosa da substância pura em metanol (CH₃OH). A partir da solução “mãe” foram preparadas, por diluição, outras soluções de concentrações mais baixas. As concentrações utilizadas na elaboração das diferentes rectas de calibração, ou seja, aquando da utilização da fibra PDMS e PDMS/DVB, encontram-se em anexo (Anexo B). Nas medições de volume das soluções padrão foram utilizadas micropipetas de 10 µL, 20 µL e 100 µL da *Gilson e Eppendorf*.

No que respeita à realização dos testes da repetibilidade, as concentrações utilizadas foram de 1 µg/L, 10 µg/L e 20 µg/L sendo que o número de amostras preparadas em cada ponto foi efectuado em triplicado.

Preparações das soluções desinfectantes - foram avaliadas quatro soluções desinfectantes, sendo que para cada uma delas foram seguidas as recomendações dos respectivos fornecedores. Depois de estarem prontas, foram transferidos 10 mL da solução desinfectante para os respectivos viais.

- a) Solução de vinagre – Foram preparadas soluções de vinagre de vinho com 6% de acidez da marca Masterchef[®], diluídas em água da rede pública. A concentração utilizada foi de 1dL de vinagre para cada 10 litros de água.
- b) Solução de ácido peracético – Foram preparadas soluções de 80 mg/L (ppm) em água da rede a partir do produto P3-Tsunami100[®] (Ecolab S.A). A concentração da solução foi aferida por titulação com

permanganato de potássio e tiosulfato de sódio, de acordo com as recomendações do fabricante.

- c) Solução de hipoclorito de sódio – Foram preparadas soluções de 70 ppm em água da rede pública a partir do produto Mikrochlor[®] (Ecolab S.A).
- d) Solução de dicloroisocianurato de sódio – Foram preparadas soluções de 50 ppm em água da rede pública a partir do produto comercial Sanichlor[®] (Ecolab S.A).

As fichas técnicas e de segurança dos respectivos produtos encontram-se em anexo (Anexo C).

3.4. Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas num equipamento de cromatografia gasosa (GC) de marca Shimadzu-2010[®], equipado com uma coluna da marca Teknokroma[®] (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno × 0,50 µm de espessura) e um detector de captura de electrões (ECD) de ⁶³Ni. De forma a permitir a visualização dos cromatogramas obtidos com as injeções efectuadas estava acoplado ao GC um computador, como se pode observar na Figura 4.



Figura 4 - Equipamento de cromatografia gasosa com detector de captura de electrões.

Foi utilizada uma balança analítica *Mettler AE 200* para a pesagem rigorosa do clorofórmio necessário para a obtenção das soluções padrão. De forma a efectuar as extracções dos viais em agitação constante, foi utilizada uma placa de agitação de marca Metrohm® (Figura 5).



Figura 5 – Extracção de clorofórmio com fibra de 65 µm PDMS/DVB em *headspace*.

3.5. Preparação da amostra

Preparação da amostra (alface) - a alface utilizada para as análises efectuadas foi gentilmente cedida por diferentes unidades de restauração colectiva da ICA – Indústria e Comércio Alimentar, S.A e recolhida apenas no dia da sua análise pelo que se encontravam sempre frescas, viçosas e com elevados níveis de turgescência no momento da sua preparação. Foram realizados ensaios com alface em pequenos pedaços e macerada (Figura 6). Previamente a ser transformada, a alface foi lavada em água corrente e seca de seguida com papel absorvente, sendo macerada ou cortada em pedaços imediatamente antes de ser pesada e colocada nos viais.



Figura 6 – Alface macerada utilizada nos ensaios com os produtos desinfectantes.

3.6. Metodologia analítica

Antes da primeira utilização, ambas as fibras (100 μm PDMS e 65 μm PDMS/DVB) foram condicionadas no injector do GC a 250°C durante uma hora numa corrente de hélio, de acordo com o manual e as recomendações do fabricante (Supelco®).

As amostras estavam contidas em viais de vidro de 20 mL, obtendo no decorrer das extracções efectuadas, um *headspace* (HS) de 10 mL onde a fibra era colocada em exposição. Desta forma, o volume da amostra seleccionado para a extracção foi também de 10 mL, tal como se pode observar na Figura 7.

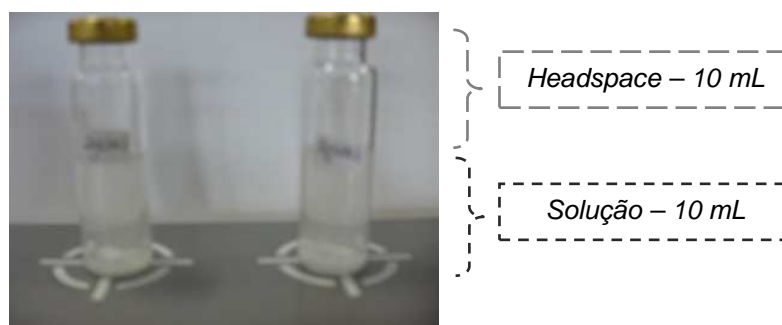


Figura 7 – Viais de 20 mL utilizados.

Para a manutenção da agitação constante, foi colocada em todos os vias uma barra magnética revestida de politetrafluoretileno (PTFE), assim como utilizada uma placa de agitação marca Metrohm[®], colocada sempre na mesma posição e de forma a obter agitação constante durante as extracções efectuadas.

Foi estudado o efeito da adição de cloreto de sódio (NaCl) entre 0 e 3 g, nas soluções de forma a avaliar o seu efeito na extracção de clorofórmio. Para a fibra PDMS escolheram-se as concentrações de 0, 1, 1,5 e 2 g, no entanto, para a utilização da fibra PDMS/DVB optaram-se pelas concentrações de 0, 1, 2 e 3 g de NaCl.

De forma a avaliar a influência do tempo da fibra em exposição na extracção de clorofórmio em HS analisaram-se os seguintes tempos: PDMS - 15, 20 e 30 minutos e PDMS/DVB - 5, 10, 15 e 20 minutos.

Antes de cada extracção efectuada, procedeu-se à limpeza da fibra num injecto a 250°C, com fluxo de hélio. A eficiência das limpezas foi controlada por uma inexistência de picos no cromatograma realizados antes de cada análise.

3.7. Análise cromatográfica

A temperatura programada do GC foi de 40°C durante 2 minutos e um aumento dos 40°C aos 150°C durante um período de 10 minutos, perfazendo assim uma corrida com um total de 13 minutos.

Na Tabela 4, encontram-se as condições de operação do cromatógrafo utilizadas nos ensaios efectuados. A temperatura do injecto e do detector foi de

250°C. O gás de arraste utilizado foi o hélio com um caudal de 1,00mL/min e o gás de *make-up* foi o azoto com um caudal de 30,0mL/min, ambos com um grau de pureza de 99,999% adquiridos à LindeSogás®.

Tabela 4 - Condições de operação do equipamento de cromatografia gasosa.

Temperatura do detector	250°C
Injector	<i>Splitless</i>
Tempo de amostragem	2,00 min
Gás de arraste	Hélio
Modo de controlo de fluxo	Pressão
Pressão	80,9kPa
Fluxo total	23,5 mL/min
Fluxo na coluna	1,00 mL/min
Velocidade linear	25,0 cm/seg
<i>Split ratio</i>	20,0

A temperatura seleccionada para a realização das extracções com a fibra PDMS/DVB foi a temperatura ambiente, considerando a maior proximidade com as condições reais de utilização dos produtos desinfectantes (temperatura verificada no ar condicionado variou entre cerca de 20-25°C).

A metodologia seguida para os mecanismos de extracção e análise cromatográfica foi adaptada da metodologia descrita por Cho *et al* (2003) ⁽³⁰⁾ e San Juan *et al* (2007) ⁽²⁹⁾.

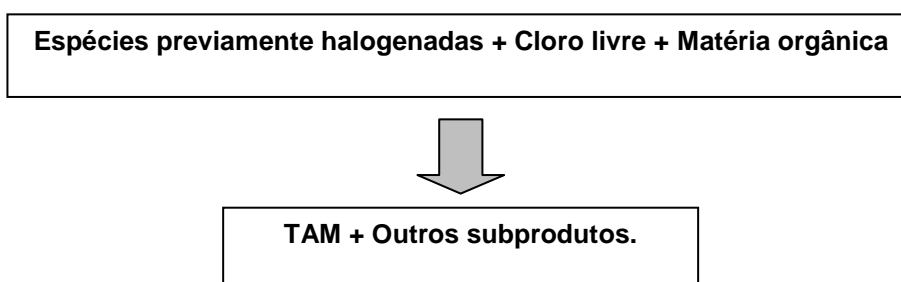
Objectivou-se, desta forma, a optimização de um método de SPME-GC-ECD-HS para a determinação de clorofórmio em amostras de diferentes soluções sanitizantes de alface.

4. Resultados e Discussão

Foi no início da década de setenta que se verificou a formação de trialometanos (TAM) durante o processo de cloração da água ⁽³⁹⁾. A desinfecção da água com cloro, etapa aplicada no tratamento da água da rede pública, que tem por objectivo a redução do risco de infecções por microrganismos patogénicos, foi, então, identificada como uma etapa responsável pela formação de vários subprodutos resultantes da desinfecção que constituem uma ameaça à saúde humana ^(39, 40).

Os TAM são compostos orgânicos voláteis (COV) de carbono simples, formados a partir da interacção do cloro residual livre com as substâncias resultantes da degradação de vegetais, denominados de substâncias húmicas (precursoras). Os compostos orgânicos naturais advêm do húmus próprio da terra e resultam da decomposição de matéria orgânica vegetal ⁽³⁰⁾.

Os TAM resultam então, de forma geral, de uma reacção que pode ser descrita da seguinte forma:



De todos os TAM possíveis de serem formados, existem quatro que aparecem em concentração mais elevada, são eles: o clorofórmio (CHCl_3), o diclorobromometano (CHBrCl_2), o dibromoclorometano (CHClBr_2) e o bromofórmio

(CHBr₃). A soma algébrica da concentração dos quatro compostos citados anteriormente denomina-se de trihalometanos totais (TAMt). Para além destes produtos, pode ocorrer a formação de outros subprodutos como os ácidos haloacéticos, haloacetonitrilas, halopicrinas, halocetonas e haloaldeídos ^(41, 42), sendo que a classe dos TAM é aquela que surge em maior concentração ^(42, 43).

Nestes últimos anos têm-se criado leis que regulamentam os limites de TAM na água para beber. Estas regulamentações surgem como consequência do conhecimento da presença e origem destes compostos na água, assim como das investigações epidemiológicas e toxicológicas que confirmam o seu potencial risco para a saúde pública. Um exemplo disso é a Directiva Comunitária 98/83/CE de 3 de Novembro destinada à água para consumo humano e transposta para o direito nacional através do DL 243/01 de 5 de Setembro. Este decreto-lei exige que a soma da concentração dos TAM seja igual ou inferior a 150 µg/L até 2008 e que a partir de 2008 este valor seja inferior ou igual a 100 µg/L.

Baytak e Sofuoglu (2008), verificaram que de entre os compostos pertencentes à classe dos TAM, o clorofórmio foi o composto que apareceu em maior quantidade na água da rede pública, apresentando concentrações entre 0,03 e 98,4 µg/L. Observou-se, ainda, que a concentração média anual de TAM obtida excedeu o limite de 80 µg/L imposto pela Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos (*USEPA – United States Environmental Protection Agency*). Constatou-se, por fim, uma maior concentração destes compostos na Primavera, comparando com a estação do Verão e do Outono, que apresentavam concentrações mais baixas ⁽⁴⁴⁾. Este facto deve-se a uma maior quantidade de biomassa (ex. algas) presente na água na estação da Primavera. Nesta estação do ano, verifica-se um excesso de nutrientes na água, o que leva à proliferação

excessiva de algas, acumulando a quantidade de matéria orgânica na água e aumentando, por consequência, a formação de clorofórmio e outros trialometanos (45).

Após o estudo da relação da ocorrência de cancro com a exposição aos TAM, houve a necessidade de estudar e quantificar esses compostos, principalmente, os compostos encontrados em maiores concentrações, como é o caso do clorofórmio.

4.1. Ensaios preliminares

A parte experimental do presente trabalho iniciou-se com a aprendizagem da técnica e a prática de extracção de SPME, bem como a utilização do GC-ECD com o respectivo *software* associado.

A determinação do pico do clorofórmio foi efectuada por injeção directa no cromatógrafo gasoso de um padrão de CHCl_3 em metanol (Merck *gradiente grade* HPLC), tendo-se verificado um tempo médio de retenção de 3,8 minutos.

No que diz respeito à escolha da fibra, a pesquisa bibliográfica revelou uma utilização muito dispersa do tipo de fibras, sendo que para a extracção de compostos da classe dos trialometanos, se verificava a utilização das fibras de 100 μm PDMS e 65 μm PDMS/DVB, assim como a fibra 85 μm CAR/PDMS.

Foram testadas duas fibras de SPME: 100 μm PDMS e 65 μm PDMS/DVB. Na Figura 8, estão representados os cromatogramas obtidos com as duas fibras na extracção de CHCl_3 da água da rede pública. Apesar da fibra PDMS/DVB revelar uma área superior à fibra PDMS utilizou-se também a fibra PDMS já que

inicialmente se obtinham brancos com elevado sinal. Esta dificuldade foi eliminada com a limpeza da fibra no injector imediatamente antes de cada ensaio.

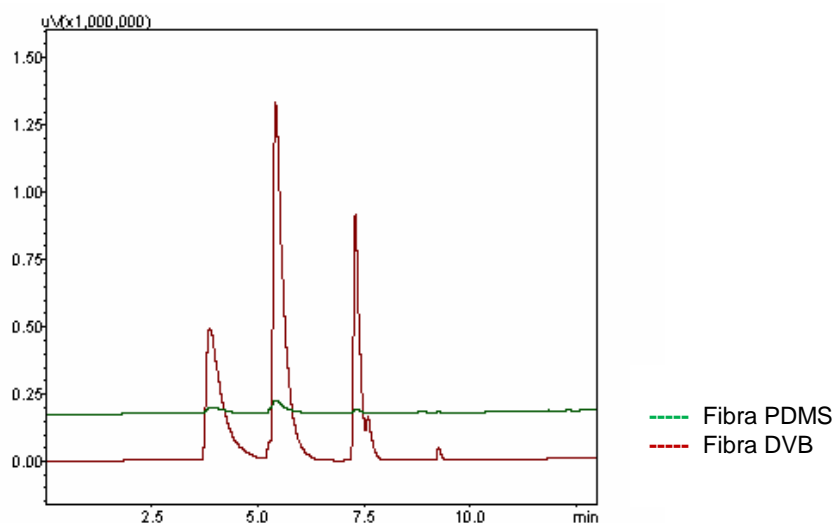


Figura 8 - Cromatograma da análise de trialometanos em água da rede pública.

4.2. Optimização do método

Após o treino inicial, procedeu-se então à optimização do processo de extracção por SPME, tendo esta acção incidido na escolha da quantidade de NaCl a adicionar à amostra, assim como na escolha do tempo da fibra em exposição.

Foram analisados diferentes tipos de preparação da amostra, isto é, alface macerada ou aos pedaços, tendo-se obtido uma maior extracção de clorofórmio após a análise à alface macerada, comparativamente com a utilização de alface aos pedaços (Figura 9). Os resultados poderão também ser resultado do processo físico utilizado na preparação da alface. A alface que foi macerada, à partida apresentará uma maior quantidade de matéria orgânica livre,

comparativamente a alface cortada aos pedaços, para reagir com o cloro e formar os compostos da classe dos trialometanos.

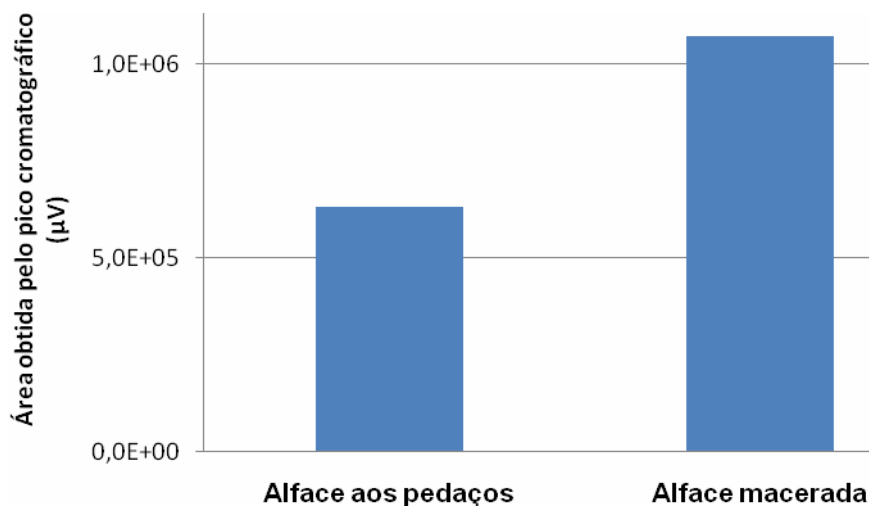


Figura 9 - Resultados da área obtida referente à extracção de clorofórmio nos dois tipos de tratamento da alface (PDMS).

Relativamente à adição de NaCl à solução, sabe-se que a sensibilidade do método de extracção frequentemente aumenta na presença deste composto. Trata-se, pois, de uma forma de alterar a distribuição entre a fase aquosa e a fase orgânica, para favorecer a extracção e que consiste em aumentar a força iónica do meio, adicionando, desta forma, cloreto de sódio à solução aquosa. Segundo diversos autores, foi observado também que a adição deste sal foi importante na libertação de compostos voláteis para o *headspace* das amostras devido à sua capacidade de absorver água, de saturar o ambiente e de libertar os compostos orgânicos voláteis ^(29, 30).

Foram testadas quatro quantidades diferentes de NaCl a adicionar às amostras, de modo a verificar qual delas permitiria uma melhor quantidade de analito extraída. Verificou-se que a adição deste sal melhorou a adsorção do analito pelas fibras extractoras (PDMS e PDMS/DVB), proporcionando um aumento dos valores das concentrações (Figura 10 e 11). Segundo os resultados obtidos com a fibra PDMS/DVB e apresentados na Figura 11, a adição de 3 g de NaCl permitiu a obtenção de maiores concentrações, no entanto, a nível prático esta adição implicava uma diminuição significativa no *headspace* disponível para a colocação da fibra em exposição, quando a alface era adicionada ao vial para análise. Desta forma, optou-se por seleccionar a adição de 2 g de NaCl a todos os vials analisados.

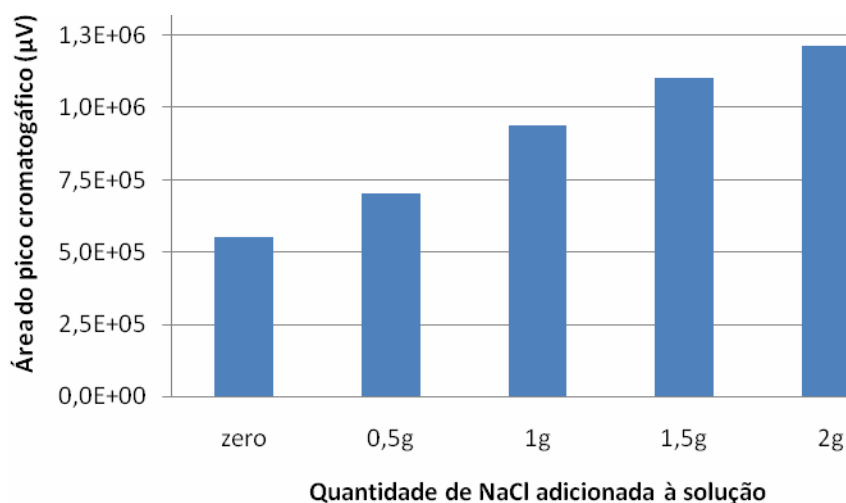


Figura 10 - Extracção de clorofórmio de acordo com a quantidade de NaCl adicionada com a fibra PDMS.

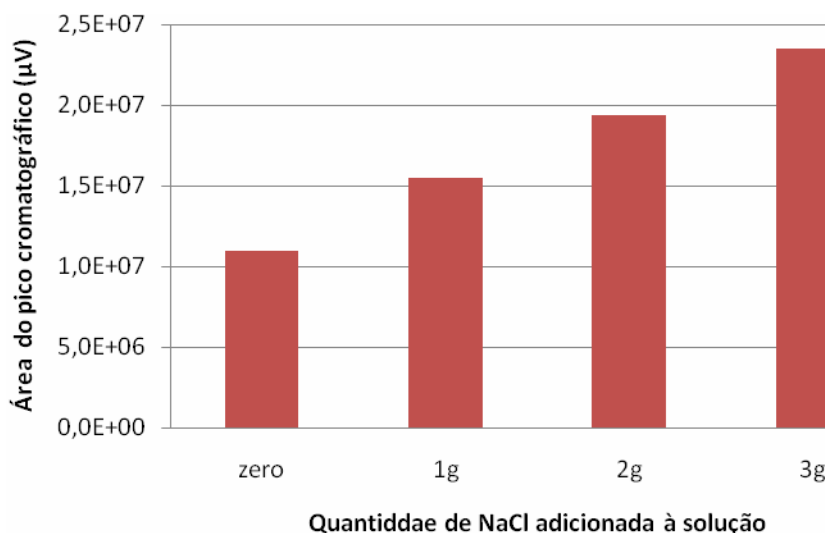


Figura 11 - Extração de clorofórmio de acordo com a quantidade de NaCl adicionada com a fibra PDMS/DVB.

Os resultados obtidos por diversos estudos corroboram os resultados obtidos pelo presente trabalho, onde se verificou que a adição de NaCl melhora a extração de clorofórmio da solução desinfetante ^(29, 30).

Esta variação das concentrações estudadas deveu-se ao facto da variável escolhida com a fibra PDMS recair na maior concentração estudada, isto é, num extremo das concentrações, então, de forma a evitar a mesma situação na análise com a fibra DVB, optou-se por aumentar a quantidade de NaCl adicionada.

No que diz respeito à optimização da variável referente ao tempo da fibra em exposição, foram estudados diferentes tempos de extração entre os 5 e os 20 minutos, de forma a avaliar a maior capacidade de extração do analito. Os resultados obtidos relativos ao tempo de exposição da fibra, encontram-se na Figura 12 e 13, onde são apresentados os resultados obtidos pela fibra PDMS e pela fibra PDMS/DVB, respectivamente.

Mais uma vez se verifica que a variável escolhida, no caso da utilização da fibra PDMS se encontrava num dos extremos, pelo que no momento da utilização da fibra DVB se optou por alargar o período estudado do tempo da fibra em exposição (Figura 13).

Nas Figuras 12 e 13, observa-se que aumentando o tempo de exposição a partir dos 15 minutos, de acordo com a linha da tendência, não há um aumento da área do cromatograma nos minutos finais, pelo que foram seleccionados os 15 minutos de exposição da fibra. Esta selecção foi baseada no tempo necessário para cada ensaio, de forma a rentabilizar o trabalho desenvolvido no laboratório, assim como para ir ao encontro da prática diária realizada nas unidades de restauração, seguindo as indicações médias do tempo de contacto dos diferentes produtos de desinfeção facilitadas pelos fornecedores dos desinfectantes, ou seja, 15 minutos com o produto hortofrutícola em imersão na solução desinfectante. Estes resultados vão ao encontro de outros obtidos por Stack *et al* (2000) onde referem que o tempo de extracção tem influência nas concentrações obtidas deste clorofórmio, uma vez que este COV necessita de 15 minutos para estabilizar ⁽²⁷⁾.

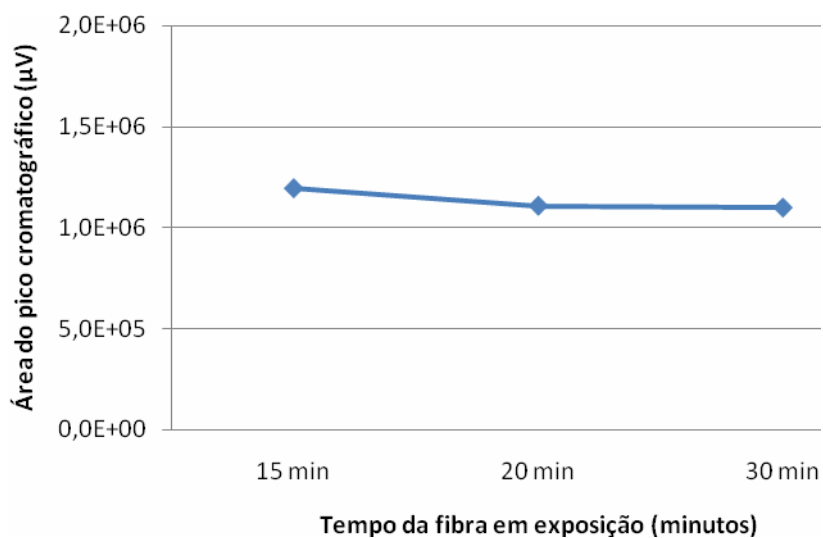


Figura 12 - Extração de clorofórmio ao longo do tempo com a fibra PDMS.



Figura 13 - Extração de clorofórmio ao longo do tempo com a fibra PDMS/DVB.

Após análise destes resultados, escolheram-se as variáveis que apresentaram os melhores resultados. De seguida, é apresentada uma tabela resumo com as características colocadas em prática nos ensaios posteriores (Tabela 5). Foram, então, definidas as seguintes condições para a extração:

colocação da fibra nos vias em HS durante 15 minutos, à temperatura ambiente, com uma adição de 2 g de NaCl e a uma velocidade de agitação constante. Após cada extracção, o suporte da fibra foi colocado no injector do GC através do septo e esta mantida em dessorção durante o período total de cada corrida, isto é, 13 minutos.

Tabela 5 – Tabela resumo das variáveis escolhidas para a execução dos ensaios.

Variável	Característica escolhida
Quantidade de NaCl adicionado	2 g
Tempo de exposição da fibra	15 Minutos
Agitação	Constante
Temperatura de extracção	Ambiente
Alface	2 g de alface macerada

4.3. Validação do método analítico de determinação do clorofórmio

A quantificação de compostos vestigiais em amostras reais por SPME é normalmente conseguida pela aplicação do método do padrão externo, na qual a recta de calibração é construída pela preparação dos padrões de forma em tudo semelhante à preparação das amostras.

Numa fase inicial realizou-se a recta de calibração do clorofórmio utilizando a fibra PDMS. Os parâmetros obtidos para a recta de calibração através desta fibra

foram: coeficiente de correlação de 0,985 e um limite de detecção (LOD) de 5,46 $\mu\text{g/L}$ (Figura 14).

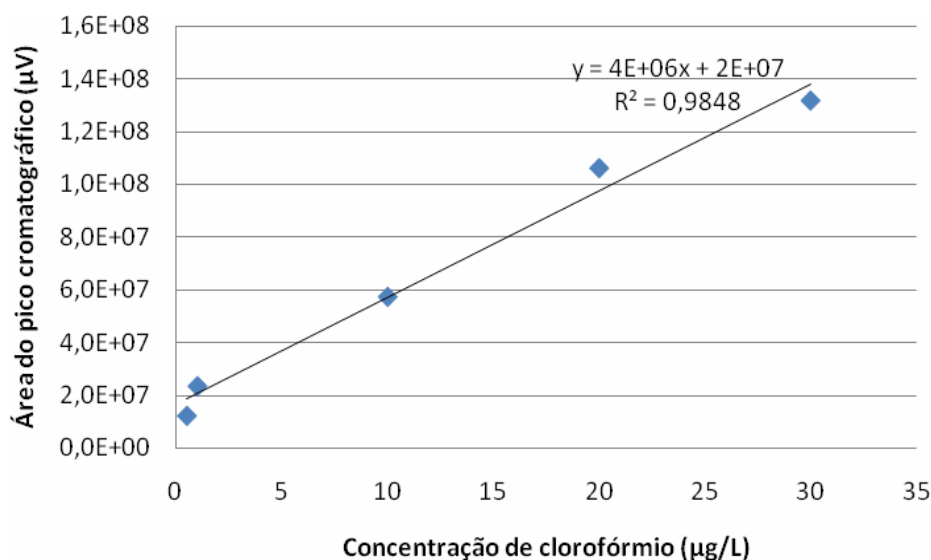


Figura 14 - Recta de calibração de clorofórmio para extracção por SPME-HS-ECD com a fibra PDMS.

Após analisar os resultados referentes à recta de calibração obtida pela extracção em SPME-HS com a fibra PDMS, decidiu-se elaborar a recta de calibração da fibra PDMS/DVB com concentrações mais baixas de forma a obter um LOD também menor, assim optou-se por um intervalo de soluções padrão nas concentrações entre 0,01 e 1,5 $\mu\text{g/L}$ (Figura 15). O coeficiente de correlação obtido foi de 0,992 com um LOD de 0,20 $\mu\text{g/L}$. Posteriormente, todas as análises foram desenvolvidas com a fibra PDMS/DVB.

As rectas de calibração foram obtidas com soluções padrão de CHCl_3 em metanol e uma adição de 2 g de NaCl.

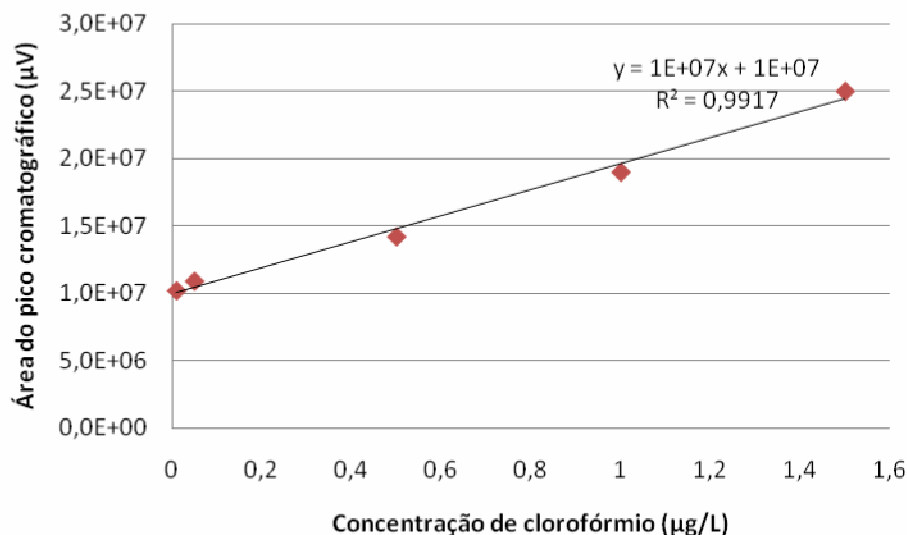


Figura 15 - Recta de calibração de clorofórmio para extração por SPME-HS-ECD com a fibra PDMS/DVB.

O estudo da validação do método analítico para a quantificação de clorofórmio em amostras analisadas por SPME assentou na determinação da recta de calibração, da repetibilidade e na determinação do LOD. O limite de detecção, ou seja, a quantidade de analito que gera uma resposta três vezes maior do que o do ruído no tempo de retenção, foi obtido com base na recta de calibração, sendo que $LOD=3 \times EPADYX / Declive$.

Ao longo do presente trabalho houve a necessidade de trocar de fibra de SPME e nessa situação fez-se nova recta de calibração como apresentado na Figura 16. Foi obtido um coeficiente de correlação superior a 0,99 e um LOD de 0,007 (Anexo B). Assim, algumas concentrações foram obtidas pela 1ª recta e 1ª fibra, outras com a 2ª recta e a 2ª fibra.

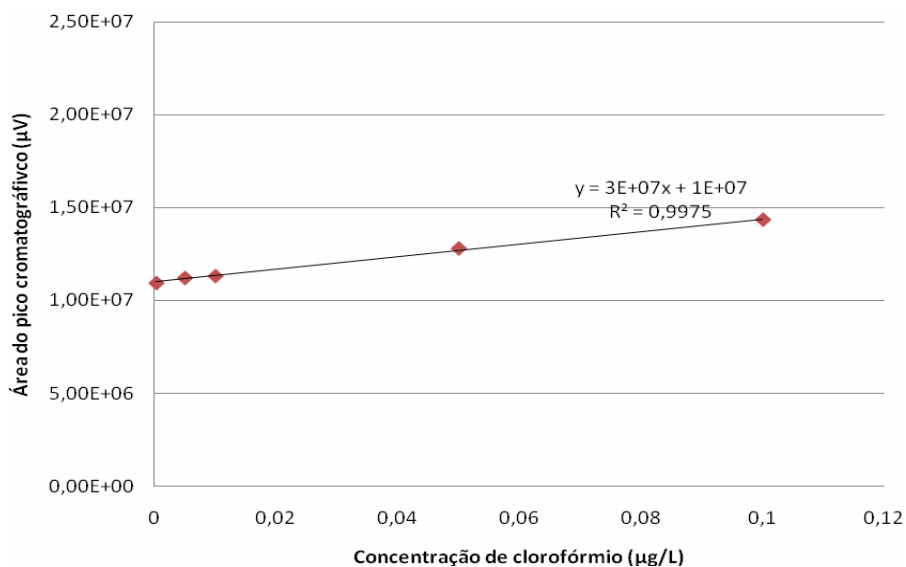


Figura 16 - Recta de calibração de clorofórmio para extracção por SPME-HS-ECD com a fibra PDMS/DVB obtida na segunda fase.

A proposta de métodos analíticos foi validada para garantir que as características de desempenho são adequadas para as condições em que tem de ser aplicado. A precisão do método, denominada de repetibilidade, foi avaliada com três repetições de três concentrações diferentes, como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados obtidos após os ensaios em triplicado referentes à repetibilidade do método (PDMS/DVB).

Solução padrão	Vial	Concentração (µg/L)	Média	Desvio padrão	CV (%)*
1 µg/L	A	2,40	2,33	0,08	3,28
	B	2,25			
	C	2,35			
10 µg/L	A	3,15	3,05	0,09	2,91
	B	3,01			
	C	2,99			
20 µg/L	A	4,25	4,12	0,16	3,78
	B	4,17			
	C	3,95			

*CV (%) – Coeficiente de variação em percentagem

Apesar de se tratar de um parâmetro que não permite comparações entre diferentes estudos científicos, sendo característico de cada trabalho e variando de acordo com as diferentes variáveis envolvidas, o desvio padrão obtido (% de erro) foi menor do que 10%, o que a nível estatístico refere uma boa repetibilidade dos ensaios efectuados nas mesmas condições.

4.4. Influência da matéria orgânica na formação de clorofórmio

A eficácia dos diferentes desinfectantes químicos mais comuns utilizados na desinfecção da superfície dos frutos e produtos hortícolas, como é o caso das

soluções de hipoclorito de sódio, pode ser limitada ou imprevisível quando uma grande quantidade de matéria orgânica está presente na água da lavagem. Para além da questão da eficácia antimicrobiana do desinfectante ser colocada em causa, também se coloca a questão da possibilidade de uma maior formação de clorofórmio com o aumento da matéria orgânica, uma vez que se trata de um precursor da reacção que leva à formação deste COV ⁽⁴⁶⁾.

Na Figura 17, encontram-se os resultados referentes às concentrações de CHCl_3 obtidas na análise de soluções desinfectantes de pastilhas de cloro activo e de ácido peracético, após a adição de até 3 g de açúcar (sacarose). Tal como anteriormente referido, quando se verifica a presença de matéria orgânica juntamente com cloro, estes reagem e originam como resultado, e entre outros compostos, o clorofórmio.

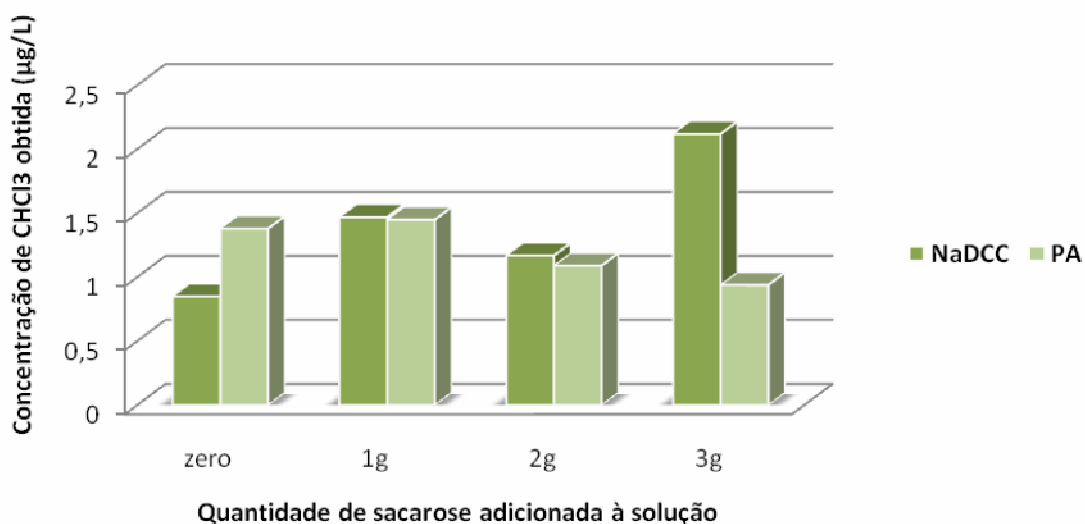


Figura 17 - Avaliação da adição de sacarose na extracção de clorofórmio nas soluções desinfectantes de ácido peracético (AP) e dicloroisocianurato de sódio (NaDCC), utilizando a fibra PDMS/DVB.

A opção pela comparação realizada entre as pastilhas de cloro e o ácido peracético baseou-se na diferente composição química dos produtos, no que diz respeito à existência de cloro, ou seja, ao contrário da pastilha de cloro, o ácido peracético não possui cloro na sua composição, pelo que apenas o cloro proveniente da água utilizada na preparação das soluções estaria disponível para reagir com a sacarose. Assim, tal como se observa nos resultados referentes à pastilha de cloro, à medida que aumenta a concentração de sacarose, também aumenta a concentração de clorofórmio formado, ou seja, a concentração inicial obtida de 0,85 µg/L sem a adição de sacarose, aumentou para 2,12 µg/L na análise efectuada com 3 g de sacarose. Pelo contrário, no caso do desinfectante ácido peracético, a concentração de CHCl_3 diminuiu à medida que foi aumentada a quantidade de sacarose adicionada, da mesma forma, a concentração inicial de 1,38 µg/L clorofórmio, diminuiu para 0,94 µg/L, após a adição de 3 g de sacarose à solução desinfectante de AP.

O estudo de Navalon e Alvaro (2008) relatou que, de forma geral, os resultados obtidos demonstraram que os sacarídeos amplamente presentes em águas naturais podem dar origem a concentrações significativas de TAM no processo de desinfecção pelo cloro⁽⁴⁷⁾.

4.5. Determinação da formação de clorofórmio após a utilização dos produtos de desinfecção testados.

A exposição humana ao clorofórmio (Figura 18), também conhecido como triclorometano (CHCl_3), pode ocorrer por inalação, por ingestão de alimentos ou de água e por absorção através da pele (no duche, nas limpezas ou na natação), tendo sido relatadas feridas na pele que surgiram após o contacto directo com a água. Alguns estudos têm demonstrado que mais de 96% do clorofórmio inalado é exalado através dos pulmões dentro de 8 horas, principalmente como dióxido de carbono e como clorofórmio inalterado, sendo que apenas uma pequena quantidade deste composto é eliminado através da urina e das fezes ⁽⁴⁸⁾.

Uma vez transportado pelo sangue, o CHCl_3 , tende a acumular-se nos tecidos com altas concentrações de lípidos, nomeadamente, o tecido adiposo, o cérebro, o fígado, o rim e o sangue. O clorofórmio é metabolizado no corpo, sendo o maior produto final o dióxido de carbono.

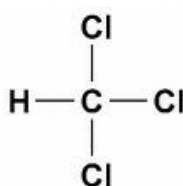


Figura 18 - Estrutura química do clorofórmio.

Em altas concentrações, o CHCl_3 pode deprimir o sistema nervoso central e induzir um estado de anestesia/inconsciência. Inalar baixas concentrações (cerca de 900 ppm) por um curto período de tempo pode causar fadiga, tonturas e dor de cabeça.

A Agência de Protecção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) considera o clorofórmio susceptível de ser um carcinogénio para os seres humanos por todas as vias de exposição em concentrações elevadas cujas condições podem levar a citotoxicidade e hiperplasia degenerativa nos tecidos sensíveis. No entanto, se a exposição ocorrer, por qualquer via de exposição, em menores concentrações que não causem citotoxicidade ou hiperplasia regenerativa, não apresentará carcinogenicidade ⁽⁴⁸⁾.

Recentemente, alguns estudos epidemiológicos demonstraram a toxicidade e os efeitos adversos da exposição humana ao clorofórmio, em particular relativos aos problemas reprodutivos, incluindo aborto espontâneo, atraso no desenvolvimento fetal e defeitos congénitos ^(40, 49-53), assim como no aumento da incidência de cancro do cólon, quer no sexo masculino ⁽⁵⁰⁾, quer nas mulheres após a menopausa ⁽⁵⁴⁾. Têm sido estudados os seus potenciais malefícios na saúde humana ^(50, 51), considerando a exposição a que se está sujeito, nomeadamente através da água da piscina ^(27, 55-57), água da rede pública (ingestão e/ou absorção através do banho ou duche) e produtos de limpeza domésticos (inalação) ^(30, 58, 59). Actualmente, acredita-se que existe uma forte relação entre o cancro da bexiga, do cólon e recto e a ingestão de água tratada, na presença de TAM, nomeadamente o clorofórmio ⁽⁶⁰⁾.

Estudos desenvolvidos em mamíferos revelaram que os TAM causam efeito adverso no fígado e no rim e afectam negativamente o sistema nervoso e reprodutivo, para além de estarem relacionados com cancro da bexiga ⁽⁴⁷⁾. Neste estudo observou-se que o pH da solução influencia fortemente a formação de

TAM e o consumo dos compostos clorados, assim como o facto da presença de cloreto em concentração de ppm aumentar a formação de TAM ⁽⁴⁷⁾.

Vários factores como a temperatura ambiente, o pH do meio, a concentração de cloro, as características da matéria orgânica (também chamada de precursores dos TAM), o tempo de reacção e a relação entre a concentração de hipoclorito e do teor de carbono orgânico total, entre outros factores, podem influenciar a formação de clorofórmio ^(45, 61). Alguns autores demonstram que o aumento da temperatura e do pH do meio, por exemplo, favorece o aumento da formação de trialometanos ^(45, 61), assim como o facto do tempo de contacto apresentar um efeito positivo na formação destes compostos ⁽⁶¹⁾.

Os subprodutos da desinfecção (SPD) constituem, desta forma, um assunto de importância com impacto na saúde pública, uma vez que alguns destes compostos são possivelmente carcinogénios para os seres humanos. De acordo com as orientações da USEPA para a Avaliação dos Riscos Cancerígenos e a classificação da Agência Internacional para a Pesquisa do Cancro (IARC), o dibromoclorometano é classificado no grupo C, por sua vez no grupo B2 estão incluídos o clorofórmio, o diclorobromometano e o bromofórmio, uma vez que se revelam prováveis carcinogénios humanos ⁽⁶²⁾.

A actual Administração da Segurança e da Saúde Ocupacionais (OSHA) adoptou como limite admissível de exposição (*Permissible Exposure Limit* - PEL) para o clorofórmio o valor de 50 ppm, ou seja, 240 miligramas por metro cúbico de ar (mg/m^3). Um trabalhador que esteja exposto ao clorofórmio deve em nenhum momento exceder este limite máximo. Por sua vez, o Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (NIOSH) estabeleceu um limite exposição recomendado (*Recommended Exposure Limit* - REL) para clorofórmio de 2 ppm

(9,78 mg/m³) como uma exposição de curto prazo, ou seja, 60 minutos. A NIOSH considera, também, o clorofórmio como um potencial carcinogénio ocupacional (48).

Num estudo realizado a nível profissional, os trabalhadores expostos a 14 – 400 ppm (68 - 1956 mg/m³) desenvolveram hepatite tóxica e outros efeitos, incluindo icterícia, náuseas e vômitos, sem febre. Num outro estudo, 68 trabalhadores foram expostos profissionalmente ao clorofórmio em concentrações de 10 - 1000 mg/m³ durante 1 a 4 anos. Foi encontrada uma maior frequência de hepatite no grupo de trabalhadores em comparação com os habitantes da mesma cidade. Dezassete desses trabalhadores apresentaram hepatomegalia, três dos quais desenvolveram hepatite. Após uma exposição crónica profissional de 375 - 1330 mg/m³ clorofórmio, com um pico de concentração de 5.680 mg/m³, por períodos de 3 a 10 anos, foi relatado por 8 trabalhadores expostos lassidão, sede, angústia gastrointestinal, frequente ardor a urinar, falta de concentração, depressão e irritabilidade. Nove trabalhadores que foram expostos a uma menor concentração de clorofórmio (110 - 350 mg/m³ para 10 - 24 meses), também experimentaram os mesmos efeitos, mas num grau menor.

Num projecto desenvolvido ao longo de cinco anos que consistia em analisar alimentos e o seu teor em compostos orgânicos voláteis (COV), verificou-se que os produtos que apresentaram o maior nível de clorofórmio foram os produtos lácteos: queijo americano (54 ppb), queijo *cheddar* (107 ppb), *cream cheese* (100 ppb), manteiga (83 ppb) e creme de leite (176 ppb). O mesmo foi verificado nos produtos lácteos dos países europeus. Foi demonstrado ainda pelo mesmo estudo que os COV advêm do uso total do processo automatizado de limpeza e desinfecção que utilizam solventes contendo cloro activo. Tal como já

foi referido anteriormente, sabe-se que o cloro ao entrar em contacto com o material orgânico, neste caso concreto presente nos lacticínios, forma compostos orgânicos clorados ou cloro orgânico total ⁽⁶²⁾. Fukayama *et al* (1986) analisaram as reacções de cloro e dióxido de cloro com modelos de compostos alimentares, tendo observado, após a exposição de camarão a uma solução desinfectante de hipoclorito de sódio uma incorporação bastante significativa de cloro nas porções edíveis. São diversas as reacções dos produtos clorados com os macro constituintes dos alimentos, nomeadamente os glícidos, os lípidos e os prótidos, no entanto, são necessários mais estudos de forma a analisarem a toxicidade desses compostos formados ⁽⁶³⁾.

Uma exposição oral ao clorofórmio, ingerido através de óleo de milho, provocou cancro, quer no Rato, quer no Ratinho. Também em humanos, foi relatado um risco pequeno mas com significado estatístico, no aumento de cancros da bexiga, do cólon e do recto associados com a presença de compostos clorados na água potável. As avaliações de risco foram difíceis por causa de vários factores concomitantes e potenciadores das mesmas patologias, nomeadamente o tabagismo, a dieta, a poluição do ar, ocupação, e os diferentes estilos de vida. O consumo de outras substâncias carcinogénias tornou impossível responsabilizar unicamente o clorofórmio como a causa do aumento de incidentes de cancro ⁽⁶²⁾.

Apesar de se pensar que a ingestão é a via mais comum para a exposição aos subprodutos da desinfecção, a sua alta volatilidade e permeabilidade dérmica de alguns deste sugerem a potencial contribuição da inalação e da absorção dérmica como vias de complementares ⁽⁵⁹⁾.

Os hortofrutícolas podem absorver clorofórmio através da água e do ar. A água é provavelmente hoje a maior fonte de exposição ambiental ao clorofórmio. O clorofórmio pode ser encontrado em toda a água clorada (água da torneira) ^{(64,} ⁶⁵⁾. Num estudo onde foi analisada a concentração de clorofórmio em produtos hortícolas, folhas de chá e legumes congelados, verificou-se uma média de concentrações de 30,9; 62,9 e 15,7 µg/kg, respectivamente. Assim, as folhas de chá apresentaram os valores de clorofórmio mais elevados. Foi relatada a formação de clorofórmio e tetracloreto de carbono durante o tratamento de vegetais com hipoclorito de sódio. Uma vez que o cloro reage rapidamente com vários compostos é possível que os trihalometanos sejam produzidos pela reacção dos alimentos com o hipoclorito de sódio. Assim, também estes alimentos poderão apresentar clorofórmio na sua composição, como aliás comprovam os resultados obtidos por Adachi *et al* (2001) ⁽⁶⁵⁾.

Uma vez que os vegetais absorvem matéria orgânica pelas raízes e a acumulam nas folhas, foram analisados os vegetais que cresceram em água da torneira e em água fervida destilada sem clorofórmio. Nesse estudo não se verificaram diferenças nos resultados entre os vegetais dos dois ensaios. Por outro lado, verificou-se uma elevada correlação entre a quantidade de clorofórmio e o número de dias de cultivo, pelo que o tempo se apresenta como um factor a considerar na formação deste composto ⁽⁶⁵⁾.

De forma a avaliar o efeito do tempo de imersão na formação de clorofórmio, optou-se por analisar as soluções desinfectantes com alface após dois períodos distintos, ou seja, após 15 e 60 minutos, em agitação. Depois deste período, efectuou-se a extracção do clorofórmio com a fibra PDMS/DVB durante os 15

minutos escolhidos nos resultados dos ensaios preliminares (tempo de exposição da fibra). Os viais foram preparados e analisados em triplicata para cada tipo de produto desinfectante.

Pode constatar-se através dos resultados obtidos que em ambos os períodos estudados (15 e 60 minutos) as soluções desinfectantes que possuem a capacidade de acidificar o meio, como é o caso do vinagre e do ácido peracético, são aquelas que originaram a menor formação de CHCl_3 . Pelo contrário, a lixívia (hipoclorito de sódio) e a pastilha de cloro (dicloroisocianurato de sódio) foram os produtos que deram origem às maiores concentrações de CHCl_3 , nos dois períodos de imersão de alface estudados. As pastilhas de cloro utilizadas na desinfecção de alface foram, por sua vez, o desinfectante químico que originou maiores concentrações de clorofórmio, nos dois períodos analisados, ou seja, $1,95 \mu\text{g/L}$ e $5,36 \mu\text{g/L}$, respectivamente (Figura 19).

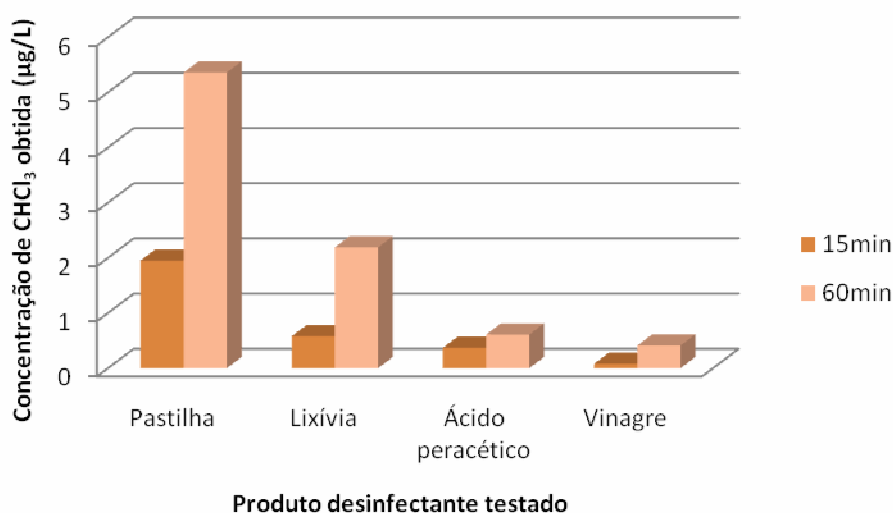


Figura 19 – Avaliação do tempo de imersão na formação de CHCl_3 de acordo com o tipo de desinfectante utilizado (PDMS/DVB).

O aumento do período de contacto entre a solução desinfectante e a alface, de 15 para 60 minutos, fez também aumentar a formação de clorofórmio por todos os produtos desinfectantes estudados, como se pode observar na Figura 19. De acordo com este resultado, parece evidente que se deva preconizar na prática um tempo de contacto (de desinfeção) curto, podendo este ser decisivo para a formação de subprodutos com risco de toxicidade.

A nível estatístico, verificamos um coeficiente de variação (CV) menor do que 15% e, portanto, aceitável neste tipo de análises (Tabela 7). O coeficiente de variação resulta da divisão do desvio padrão pela média.

Tabela 7 – Resultados obtidos na análise das soluções desinfectantes após 15 e 60 minutos em agitação.

Desinfectante	TEMPO EM AGITAÇÃO					
	15 minutos			60 minutos		
	Média* ($\mu\text{g/L}$)	sd	CV (%)	Média* ($\mu\text{g/L}$)	sd	CV (%)
Pastilha	1,95	0,09	4,79	5,36	0,56	10,41
Lixívia	0,58	0,07	11,88	2,19	0,18	8,12
Ácido peracético	0,37	0,05	12,95	0,61	0,08	12,78
Vinagre	0,08	0,01	6,57	0,41	0,04	10,11

* Média da concentração obtida pelos três ensaios realizados; sd – Desvio padrão.

Apesar de não se ter medido o pH das soluções desinfectantes analisadas, o que se poderá traduzir numa limitação do presente trabalho, a composição química dos produtos de desinfeção contribuem para acidificar o meio da

solução desinfectante, reduzindo desta forma a formação de clorofórmio (em meio ácido).

Navalon *et al* (2008), no estudo desenvolvido acerca dos glúcidos como precursores de TAM, verificaram que a cloração realizada a pH ácido (pH=5) claramente reduziu a quantidade de TAM formados. A titulação concomitante de cloro consumido indicou que a redução da formação da TAM em meio ácido é uma consequência da menor reactividade do cloro. Por outro lado, apesar de se observar um elevado consumo de cloro a pH básico (pH=11), não se constatou uma relação linear entre o consumo de cloro e o aumento da formação de TAM⁽⁴⁷⁾.

As concentrações de CHCl_3 obtidas após a imersão da alface na solução desinfectante de pastilha de cloro durante 60 minutos, apesar de significativamente inferiores (5,36 $\mu\text{g/L}$) aos 2 ppm de REL referidos pela NIOSH⁽⁴⁸⁾, não devem ser negligenciadas, considerando a frequência diária da realização destas operações. Verificou-se, ainda, a mesma situação no caso da solução desinfectante preparada à base de hipoclorito de sódio (lixívia) que apresentou uma concentração média de clorofórmio de 2,19 $\mu\text{g/L}$. Assim, para além da via da inalação e/ou absorção pela pele por parte dos manipuladores de alimentos, será necessário avaliar também o efeito da ingestão de clorofórmio absorvida pelos alimentos sujeitos à desinfecção, o que não foi realizado no presente trabalho.

Vários tipos de tratamento de desinfecção química são conhecidos por serem parcialmente eficazes na eliminação de organismos da superfície dos hortofrutícolas que quando consumidos em cru ou incorrectamente manuseados podem causar doenças de origem alimentar. No entanto, nenhum desses tratamentos pode ser invocado até se produzir a desinfecção total bruta, pelo

menos quando administrado em níveis que não cause deterioração na qualidade sensorial. Cada tipo de desinfetante tem a sua própria eficácia em matar células microbianas. Essa eficácia depende da natureza das células, bem como das características dos tecidos vegetais e das frutas, tal como da sua contaminação inicial, entre outros factores. Alguns tipos de desinfetantes são apropriados para o uso em contacto directo com lavagens, enquanto outros são adequadas apenas para o equipamento ou para os contentores utilizados para processar, armazenar ou transportar frutas e legumes. Desta forma, a escolha do desinfetante a utilizar tal como o cumprimento das recomendações dos fornecedores é fundamental ⁽¹²⁾.

No que diz respeito à resistência dos microrganismos aos produtos desinfetantes, sabe-se que esta varia muito com o tipo de desinfetante e o pH da solução, com o tempo de contacto, a temperatura e as propriedades físicas e químicas da superfície dos frutos ou hortícolas. São necessários mais estudos acerca da eficácia de desinfetantes em relação à rugosidade da superfície dos frutos e vegetais de forma a esclarecer a influência desta característica na resistência aos produtos químicos utilizados. Apenas se reconhece que uma maior quantidade de material na cutícula pode proteger contra a incorporação de células, aumentando assim a necessidade de exposição aos tratamentos químicos ⁽²²⁾.

Esta ambiguidade em relação ao uso do cloro como oxidante tem provocado uma aparente contradição no meio científico. Enquanto o uso reduzido do desinfetante é encorajado para um limite de formação de subprodutos, a preocupação em torno de doenças mais resistentes da água desencorajam a redução da concentração do cloro. Para essa questão, deve-se encontrar uma condição óptima para que haja pequena formação de subprodutos de desinfecção

e, ao mesmo tempo, seja possível controlar a carga microbiana dos alimentos que poderá dar origem a toxinfecções alimentares.

São vários os factores que influenciam a reacção de formação de trialometanos, nomeadamente: o tempo de contacto, o pH, a temperatura, a concentração do brometo e iodeto, a concentração do cloro, a concentração e as características estruturais dos precursores, entenda-se matéria orgânica ^(22, 27).

Em relação ao tempo de contacto, a reacção de formação de trialometanos, nas condições normais de temperatura e pressão, não ocorrem instantaneamente. Quanto maior o tempo de contacto entre o cloro e o material precursor maior será a probabilidade de formação de TAM, como foi acima verificado e referido.

Como podemos verificar através dos resultados obtidos, concentração de matéria orgânica no meio é outra característica importante para a formação dos TAM, assim, quanto maior esta presença, maior será a formação deste composto. A matriz da matéria orgânica também influencia a formação de TAM. Igualmente, quanto maior a concentração de cloro no meio, maior será a possibilidade da formação de trialometanos. A forma como o cloro se apresenta também interfere, sendo que o cloro livre possui maior poder de oxidação.

Levando em conta os perigos destes compostos, a escolha da utilização destes produtos deve ser considerada após uma avaliação global e ponderada do impacto da desinfecção na saúde pública, não apenas a nível da qualidade microbiológica, mas também da toxicidade dos desinfectantes e dos seus produtos de reacção, nomeadamente a formação de compostos da classe dos trialometanos, como é o caso do clorofórmio.

5. Conclusão

A técnica de SPME é uma técnica rápida e de fácil manuseamento, apresentando-se como uma técnica com inúmeras vantagens na determinação de clorofórmio, um composto orgânico volátil, em headspace em soluções desinfectantes de alface.

A adição de NaCl à solução desinfectante, bem como o aumento do tempo de exposição da fibra, melhoram a extracção deste composto. A matéria orgânica (mais concretamente, a sacarose) e a presença de cloro potenciam a formação de clorofórmio, uma vez se trata da presença de precursores para a geração deste composto.

A etapa da desinfecção, enquanto formadora de compostos orgânicos voláteis, nomeadamente, o clorofórmio, vem aumentar as concentrações deste composto nos hortícolas, uma vez que estes o podem absorver através do ar e da água. Desta forma, as concentrações de clorofórmio encontradas nos hortofrutícolas poderão resultar, não apenas das concentrações deste composto existentes no meio ambiente, mas também da aplicação de etapas durante o processamento dos hortofrutícolas, como é o caso da desinfecção química.

A desinfecção com pastilhas de cloro foi aquela que originou uma maior formação de clorofórmio, após uma imersão da solução em 15 e em 60 minutos, logo seguida da solução de hipoclorito de sódio, portanto, as duas soluções com cloro na sua composição. Pelo contrário, o vinagre e o ácido peracético foram aquelas que evitaram a maior formação do composto orgânico volátil analisado. Apesar de se verificar a formação de baixas concentrações de clorofórmio, o presente trabalho demonstra que este perigo químico não deve ser descurado tendo em consideração a frequência diária da utilização destas soluções de

desinfetantes químicos, no limite devem ser consideradas medidas que minimizem o contacto directo do manipulador, como exemplo a utilização de equipamento (nomeadamente, máscara) adequado, ou a existência de extracção directa de fluxo de ar no local onde ocorre a desinfeção.

Não se devendo minimizar o processo de desinfeção, devem ser criadas as condições que, na medida do possível, impeçam a formação destes compostos, sendo recomendável desenvolver condições para a optimização dos processos de tratamento, assim como controlar de forma adequada a qualidade dos produtos alimentares.

Todo o processo operacional de desinfeção deve, então, ser emoldurado com a consciencialização e implementação das Boas Práticas de Higiene e as Análises dos Perigos e Pontos Críticos de Controlo assim como um bom conhecimento e domínio dos equipamentos e processos envolvidos, começando no campo e terminando no prato.

6. Referências Bibliográficas

1. Van-Duyn MA, Pivonka K. Overview of the health benefits of fruits and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature. *J Am Diet Assoc.* 2000; 100(12):1511-21.
2. Rolls BJ, Ello-Martin JA, Tohill BC. What can intervention studies tell us about the relationship between fruit and vegetable consumption and weight management. *Nutr Rev.* 2004; 62(1):1-17.
3. The World Health Report, Reducing risks, promoting health. Geneva, World Health Organization, 2002.
4. Allende A, Tomás-Barberán FA, Gil MI. Minimal processing for healthy traditional foods. *Trends in Food Science & Technology.* 2006; 17:513-19.
5. World Health Organization. Global strategy on diet, physical activity and health. 2004 [citado em 2009 Set 28]. Disponível em http://www.who.int/dietphysicalactivity/strategy/eb11344/strategy_english_web.pdf.
6. Franchini B, Rodrigues S, Graça P, de Almeida MDV. A nova roda dos alimentos: um guia para a escolha alimentar diária. *Nutricias.* 2004; (4):55-56.
7. Vandekinderen I, Camp JV, Devlieghere F, Veramme K, Denon Q, Ragaert P, et al. Effect of decontamination agents on the microbial population, sensorial quality, and nutrient content of grated carrots (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2008; 56:5723-31.
8. Olmez H, Kretzschmar U. Potential alternative disinfection methods for organic fresh-cut industry for minimizing water consumption and environmental impact. *LWT - Food Science and Technology.* 2009; 42(3):686-93.
9. Sapers GM. Efficacy of washing and sanitizing methods for disinfection of fresh fruit and vegetable products. *Food Technology and Biotechnology.* 2001; 39(4):305-11.
10. Rivera EV. A review of chemical disinfection methods for minimally processed leafy vegetables. Manhattan, Kansas: Kansas State University; 2005.
11. Nascimento MS, Silva N, Catanozi MPLM, Silva KC. Avaliação comparativa de diferentes desinfetantes na sanitização de uva. *Brazilian Journal of Food Technology.* 2003; 6(1):63-68.
12. Beuchat LR. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw: a review. *Food Safety Issues, Food Safety Unit.* World Health Organization, Geneva. 1998; WHO/FSF/FOS/98.2
13. Silva Nd, Silveira NFdA, Yokoya F, Okazaki MM. Ocorrência de *Escherichia coli* O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 2003; 23(2):167-73.
14. Akbas MY, Olmez H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids. *Letters in Applied Microbiology.* 2007; 44:619-24.
15. Ruiz-Cruz S, Acedo-Félix E, Díaz-Cinco M, Islas-Osuna MA, González-Aguilar GA. Efficacy of sanitizers in reducing *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* populations on fresh-cut carrots. *Food Control.* 2007; 18:1383-90.
16. Meldrum RJ, Little CL, Sagoo S, Mithani V, McLauchlin J, de Pinna E. Assessment of the microbiological safety of salad vegetables and sauces from kebab take-away restaurants in the United Kingdom. *Food Microbiology.* 2009; 26:573-77.

17. Guide to minimize microbial food safety hazards for fresh fruits and vegetables. Center for Food Safety and Applied Nutrition, Food and Drug Administration, College Park, MD, USA, 1998.
18. Parish ME, Beuchat LR, Suslow TV, Harris LJ, Garrett EH, Farber JN, et al. Chapter V - Methods to reduce/eliminate pathogens from fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2003; 2 (S):161-73.
19. CAC [Codex Alimentarius Commission]. 1993. Code of Hygienic Practice for Precooked and Cooked Foods in Mass Catering. CAC/RCP39-1993. Disponível em http://codexalimentarius.net/download/standards/10200/cxp_039e.pdf.
20. Brackett RE. Self stability and safety of fresh produce as influenced by sanitation and disinfection. *Journal of Food Protection*. 1992; 55(10):804-14.
21. Sanz S, Giménez M, Olarte C, Lomas C, Portu J. Effectiveness of chlorine washing disinfection and effects on the appearance of artichoke and borage. *Journal of Applied Microbiology*. 2002; 93:986-93.
22. Gil MI, Selma MV, López-Gálvez F, Allende A. Fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*. 2009; 134(1-2):37-45.
23. Paíga P, Morais S, Correia M, Delerue-Matos C, Alves A. Determination of carbamate and urea pesticide residues in fresh vegetables using microwave-assisted extraction and liquid chromatography. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2009; 89(3):199-210.
24. Zhang S, Farber JM. The effects of various disinfectants against *Listeria monocytogenes* on fresh-cut vegetables. *Food Microbiology*. 1996; 13:311-21.
25. Qiang Z, Demirkol O, Ercal N, Adams C. Impact of food disinfection on beneficial biotin contents in vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(25):9830-40.
26. Ruiz-Cruz S, Islas-Osuna MA, Sotelo-Mundo RR, Vázquez-Ortiz F, González-Aguilar GA. Sanitation procedure affects biochemical and nutritional changes of shredded carrots. *Journal of Food Science*. 2007; 72(2):S146-S52.
27. Stack MA, Fitzgerald G, O'Connell S, James KJ. Measurement of trihalomethanes in potable and recreational waters using solid phase micro extraction with gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere*. 2000; 41(11):1821-26.
28. Valente ALP, Augusto F, Montero L, da Rocha EC, Pawliszyn J. Application of SPME (solid phase micro-extraction) to the analysis of drinkable water from three locations in the state of Sao Paulo. *Química Nova*. 1998; 21(6):804-06.
29. San Juan PM, Carrillo JD, Tena MT. Fibre selection based on an overall analytical feature comparison for the solid-phase microextraction of trihalomethanes from drinking water. *Journal of Chromatography A*. 2007; 1139(1):27-35.
30. Cho DH, Kong SH, Oh SG. Analysis of trihalomethanes in drinking water using headspace-SPME technique with gas chromatography. *Water Research*. 2003; 37(2):402-08.
31. Freitas AMC, Parreira C, Vilas-Boas L. Comparison of two SPME fibers for differentiation of coffee by analysis of volatile compounds. *Chromatographia*. 2001; 54:647-52.
32. Valente ALP, Augusto F. Microextração por fase sólida. *Química Nova*. 2000; 23(4):523-30.

-
33. Stashenko EE, Martínez JR. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2007; 70:235-42.
 34. Arrebola FJ, Gonzalez-Rodriguez MJ, Frenich AG, Marin-Juan A, Vidal JLM. Determination of halogenated solvents content in olive oil by two completely automated headspace techniques coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2005; 552(1-2):60-66.
 35. Lara-Gonzalo A, Sánchez-Uría JE, Segovia-García E, Sanz-Medel A. Critical comparison of automated purge and trap and solid-phase microextraction for routine determination of volatile organic compounds in drinking water by GC-MS. *Talanta*. 2008; 74:1455-62.
 36. Guimarães AD, Carvalho JJ, Gonçalves C, Alpendurada MdF. Simultaneous analysis of 23 priority volatile compounds in water by solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry and estimation of the method's uncertainty. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2008; 88(3):151-64.
 37. Kalua CM, Bedgood-Jr. DR, Prenzler PD. Development of a headspace solid phase microextraction-gas chromatography method for monitoring volatile compounds in extend time-course experiments of olive oil. *Analytica Chimica Acta*. 2006; 556:407-14.
 38. Ducki S, Miralles-Garcia J, Zumbé A, Tornero A, Storey DM. Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta*. 2008; 74:1166-174.
 39. Komulainen H. Experimental cancer studies of chlorinated by-products. *Toxicology*. 2004; 198:239-48.
 40. Lewis C, Suffet IH, Ritz B. Estimated effects of disinfection by-products on birth weight in a population served by a single water utility. *American Journal of Epidemiology*. 2006; 163:38-47.
 41. Chowdhury S, Champagne P. Risk from exposure to trihalomethanes during shower: probabilist assessment and control. *Science of the Total Environment*. 2009; 407:1570-78.
 42. Lee J, Ha K-T, Zoh K-D. Characteristics of trihalomethane (THM) production and associated health risk assessment in swimming pool waters treated with different disinfection methods. *Science of the Total Environment*. 2009; 407:1990-97.
 43. Tominaga MY, Midio AF. Exposição humana a trihalometanos presentes em água tratada. *Revista Saúde Pública*. 1999; 33(4):413-21.
 44. Baytak D, Sofuoglu A, Inal F, Sofuoglu SC. Seasonal variation in drinking water concentrations of disinfection by-products in IZMIR and associated human health risks. *Science of the Total Environment*. 2008; 407(1):286-96.
 45. Borges JT, Sparrapan R, Guimarães JR, Eberlin MN, Augusti R. Chloroform formation by chlorination aqueous algae suspensions: online monitoring via membrane introduction mass spectrometry. *Journal of Brazilian Chemical Society*. 2008; 19(5):950-55.
 46. Adams MR, Hartley AD. Factors affecting the efficacy of washing procedures used in the production of prepared salads. *Food Microbiology*. 1989; 6:69-77.

-
47. Navalon S, Alvaro M, Garcia H. Carbohydrates as trihalomethanes precursors. Influence of pH and the presence of Cl(-) and Br(-) on trihalomethane formation potential. *Water Research*. 2008; 42(14):3990-4000.
 48. Occupational Safety & Health Administration. Occupational safety and health guideline for chloroform [citado em 2009 Set 03]. Disponível em <http://www.osha.gov/SLTC/healthguidelines/chloroform/recognition.html>.
 49. Hwang BF, Jaakkola JJ, Guo HR. Water disinfection by-products and the risk of specific birth defects: a population-based cross-sectional study in Taiwan. *Environmental Health*. 2008; 7:23.
 50. Hamidin N, Yu QJ, Connell DW. Human health risk assessment of chlorinated disinfection by-products in drinking water using a probabilistic approach. *Water Research*. 2008; 42:3263-74.
 51. Arbuckle TE, Hrudey SE, Krasner SW, Nuckols JR, Richardson SD, Singer P, et al. Assessing exposure in epidemiologic studies to disinfection by-products in drinking water: report from an international workshop. *Environmental Health Perspectives*. 2002; 110(suppl 1):53-60.
 52. Nieuwenhuijsen MJ, Toledano MB, Bennett J, Best N, Hambly P, Hoogh Cd, et al. Chlorination disinfection by-products and risk of congenital anomalies in England and Wales. *Environmental Health Perspectives*. 2008; 116(2):216-22.
 53. Ross MK, Pegram RA. Glutathione transferase theta 1-1-dependent metabolism of the water disinfection byproduct bromodichloromethane. *Chemical Research in Toxicology*. 2003; 16(2):216-26.
 54. Doyle TJ, Zheng W, Cerhan JR, Sellers C-PHTA, Kushi LH, Folsom AR. The association of drinking water source and chlorination by-products with cancer incidence among postmenopausal women in Iowa: a prospective cohort study. *American Journal of Public Health*. 1997; 87:1168-76.
 55. Bernard A. Chlorination products: emerging links with allergic diseases. *Current Medicinal Chemistry*. 2007; 14:1771-82.
 56. Kim H, Shim J, Lee S. Formation of disinfection by-products in chlorinated swimming pool water. *Chemosphere*. 2002; 46:123-30.
 57. Weaver WA, Li J, Wen Y, Johnston J, Blatchley MR, Blatchley III ER. Volatile disinfection by-products analysis from chlorinated indoor swimming pools. *Water Research*. 2009; 43:3308-18.
 58. Odabasi M. Halogenated volatile organic compounds from the use of chlorine-bleach-containing household products. *Environmental Science & Technology*. 2008; 42(5):1445-51.
 59. Villanueva CM, Cantor KP, Grimalt JO, Malats N, Silverman D, Tardon A, et al. Bladder cancer and exposure to water disinfection by-products through ingestion, bathing, showering and swimming pools. *American Journal of Epidemiology*. 2007; 165(2):148-56.
 60. Fabrizi L, Taylor GW, Canas B, Boobis AR, Edwards RJ. Adduction of the chloroform metabolite phosgene to lysine residues of human histone H2B. *Chemical Research in Toxicology*. 2003; 16:266-75.
 61. Nikolaou AD, Golfinopoulos SK, Lekkas TD, Arhonditsis GB. Factors affecting the formation of organic by-products during water chlorination: a bench-scale study. *Water, Air and Soil Pollution*. 2004; 159:357-71.
 62. Fleming-Jones ME, Smith RE. Volatile organic compounds in foods: a five year study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51:8120-27.

-
63. Fukayama MY, Tan H, Wheeler WB, Wei CI. Reactions of aqueous chlorine and chlorine dioxide with model food compounds. *Environmental Health Perspectives*. 1986; 69:267-74.
64. Adachi A, Ikeda C, Takagi S, Fukao N, Yoshi E, Okamo T. Studies on the origin of chloroform in vegetables. *Journal of Health Sciences*. 2001; 47(6):539-43.
65. Adachi A, Ikeda C, Takagi S, Fukao N, Yoshi E. Gas chromatographic analysis of vegetables for chloroform. *Analytical Letters*. 2001; 34(1):137-44.
66. Meyer ST. O uso de cloro na desinfecção de águas, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. *Cadernos de Saúde Pública*. 1994; 10(1):99-110.
67. Li Y, Brackett RE, Chen JR, Beuchat LR. Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 inoculated onto cut lettuce before or after heating in chlorinated water, followed by storage at 5°C or 15°C. *Journal of Food Protection*. 2001; 64(3):305-9.
68. Escudero ME, Velazquez L, Di Genaro MS, De Duzman AS. Effectiveness of various disinfectants in the elimination of *Yersinia enterocolitica* on fresh lettuce. *Journal of Food Protection*. 1999; 62:665-9.
69. Wei C-I, Huang TS, Kim JM, Lin WF, Tamplin ML, Bartz JA. Growth and survival of *Salmonella montevideo* on tomatoes and disinfection with chlorinated water. *Journal of Food Protection*. 1995; 58(8):829-36.
70. Han Y, Sherman DM, Linton RH, Nielsen SS, Nelson PE. The effects of washing and chlorine dioxide gas on survival and attachment of *Escherichia coli* O157:H7 to green pepper surfaces. *Food Microbiology*. 2000; 17:521-33.
71. Stopforth JD, Mai T, Kottapalli B, Samadpour M. Effect of acidified sodium chlorite, chlorite and acidic electrolyzed water on *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* inoculated onto leafy greens. *Journal of Food Protection*. 2008; 71(3):625-28.
72. Inatsu Y, Bari ML, Kawamoto S. Application of acidified sodium chlorite prewashing treatment to improve the food hygiene of lightly fermented vegetables. *Japan Agricultural Research Quarterly*. 2007; 41(1):17-23.
73. Selma MV, Beltrán D, Allende A, Chacón-Vera E, Gil MI. Elimination by ozone of *Shigella sonnei* in shredded lettuce and water. *Food Microbiology*. 2007; 24:492-99.
74. Wu FM, Doyle MP, Beuchat LR, Wells JG, Mintz ED. Fate of *Shigella sonnei* on parsley and methods of disinfection. *Journal of Food Protection*. 2000; 63(5):568-72.
75. Chang J-M, Fang TJ. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovars Typhimurium in iceberg lettuce and antimicrobial effect of rice vinegar against *E. coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 2007; 24:745-51.
76. Vandekinderen I, Van Camp J, De Meulenaer B, Veramme K, Denon Q, Ragaert P. The effect of the decontamination process on the microbial and nutritional quality of fresh-cut vegetables. *Acta Horticulturae*. 2007; 746:173-79.
77. Bauermeister LJ, Bowers JWJ, Townsend JC, McKee SR. Validating the efficacy of peracetic acid mixture as an antimicrobial in poultry chillers. *Journal of Food Protection*. 2008; 71(6):1119-22.

7. Anexos

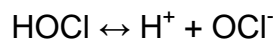
Anexo A – Descrição da eficácia antimicrobiana de diferentes desinfetantes químicos.

1. Cloro (Hipoclorito)

Em água pura, o cloro na sua forma gasosa (Cl_2) forma o ácido hipocloroso (HOCl), na temperatura ambiente conforme a reacção abaixo indicada:



A reacção desloca-se para a direita, quando o pH do meio se encontra acima de 4, ficando pouco Cl_2 em solução. Porém, quando o pH do meio é menor do que 4, a reacção predominante é no sentido da formação de cloro. A acção desinfetante e oxidante do cloro é controlada pelo ácido hipocloroso, um ácido fraco. É um ácido fraco que se dissocia formando o ião hipoclorito:



A dissociação do ácido hipocloroso é fraca, quando o pH do meio é inferior a 6. Em soluções de pH menor que 2, a forma predominante é o Cl_2 ; para valores próximos de 5, a concentração maior é do HOCl . Em pH igual a 10, a predomina o composto ClO . As percentagens de cloro livre, como HOCl , em soluções de pH igual a 6 ou a 8, são de cerca de 97% e de 23%, respectivamente, constatando-se que uma ligeira alteração no pH da solução possui um grande prejuízo na eficácia do desinfetante à base de cloro ⁽¹²⁾.

As águas da rede pública apresentam valores de pH entre 5 e 10. Nesse intervalo de pH, as espécies que se encontram em maior quantidade no meio são

o ácido hipocloroso (HClO) e o ião hipoclorito (OCl⁻). Esses compostos são definidos como cloro residual ⁽⁶⁶⁾. O ácido hipocloroso (HClO) é a forma de cloro livre disponível que apresenta a maior actividade bactericida contra uma ampla gama de microrganismos. A concentração de HClO é também significativamente afectada pela temperatura, pela presença de matéria orgânica, pela luz, ar e metais. Por exemplo, os níveis crescentes de matéria orgânica diminuem a concentração de HClO e, por consequência, a actividade antimicrobiana.

Desde há já muitos anos que o cloro é utilizado na desinfectação de água e de alimentos ^(9, 49). As formas mais comuns de cloro livre incluem o cloro líquido, os hipocloritos (de sódio e de cálcio, por exemplo) e as pastilhas de cloro efervescentes (dicloroisocianurato de sódio). Os produtos clorados, como os sais de hipoclorito, constituem o grupo de compostos sanitizantes mais utilizado. As concentrações recomendadas de cloro pertencem ao intervalo entre 50 e 200 ppm com um tempo de contacto de 1 a 3 minutos para desinfectar superfícies de alimentos e equipamentos de processamento ⁽¹²⁾. O hipoclorito de sódio (vulgarmente denominada de lixívia), é talvez o desinfectante mais utilizado por ter uma acção rápida, de fácil aplicação e completa dissociação na água. No entanto, devido às controvérsias quanto à toxicidade do cloro nos alimentos, têm sido estudados e utilizados outro tipo de produtos desinfectantes ⁽¹¹⁾.

Esta prática pode levar à formação de subprodutos que podem afectar a saúde da população, uma vez que o cloro reage com os ácidos húmicos contidos na matéria orgânica natural formando subprodutos altamente tóxicos, chamados de trihalometanos. Apesar de se tratar de um desinfectante eficaz, a sua actividade antimicrobiana é diminuída com a existência de matéria orgânica na água de lavagem ⁽¹⁵⁾ e com o aumento do pH, tal como descrito anteriormente.

Têm sido investigados os efeitos do cloro sobre diferentes bactérias patogénicas inoculadas em alimentos, no entanto, os resultados são controversos. Os estudos indicam que as concentrações de cloro tradicionalmente utilizadas na desinfecção de produtos alimentares (<200 ppm) não são particularmente eficazes na redução da população microbiana na alface. A sobrevivência de *E. coli* O157: H7 em alface cortada em peças, após imersão por 90 segundos numa solução de 20 ppm de cloro a uma temperatura de 20 ou 50°C, não foi significativamente diferente do tratamento sem utilização de cloro⁽⁶⁷⁾. O tratamento de alface com *spray* com 200 ppm de cloro não foi mais eficaz na remoção de *E. coli* O157:H7 do que o tratamento com água desionizada⁽¹²⁾. O aumento do tempo de exposição de 1 para 5 minutos não resultou num aumento da desinfecção do produto. Da mesma forma, um procedimento padronizado para a lavagem de folhas de alface foi apenas ligeiramente melhorado com a inclusão de 100 ppm de cloro na água da torneira. Apesar da redução do pH da solução de cloro entre 4,5 e 5,0 aumentar a letalidade até 4 logaritmos (log), um aumento no tempo de lavagem (de 5 para 30 minutos) não resultou num aumento da remoção de microrganismos⁽¹⁰⁾.

Zhang e Farber (1996) sugerem que a inactivação de *L. monocytogenes* em vegetais através do cloro é limitada. Estes autores demonstraram que o tratamento de alface e repolho desfiado com soluções de 200 ppm de cloro por 10 minutos reduziu a população de *L. monocytogenes* em 1,7 e 1,2 log de unidades formadoras de colónias (UFC) /g, respectivamente. As reduções foram apenas marginalmente superiores quando o tempo de exposição aumentou de 1 para 10 minutos⁽²⁴⁾. Da mesma forma, a exposição, durante 10 minutos, de *Yersinia enterocolitica* em alface desfiada, em soluções de cloro de 100 e 300 ppm,

resultou em reduções da população microbiana de aproximadamente 2 a 3 log. Os resultados a 4°C e 22°C não foram significativamente diferentes ($P < 0,05$). Nesse mesmo estudo, uma combinação de 100 ppm de cloro e 0,5% de ácido láctico inativaram *Y. enterocolitica* por mais do que 6 logaritmos. Estes resultados sugerem que a *Y. enterocolitica* pode ser mais sensível ao cloro do que outros agentes patogénicos ⁽⁶⁸⁾.

Foi observado por Wei *et al* que quando *Salmonella Montevideo* era inoculada em rachaduras de tomates verdes maduros, estas sobreviviam ao tratamento com cloro na concentração de 100 ppm ⁽⁶⁹⁾.

Foram também avaliados os tratamentos de produtos alimentares com maiores concentrações de cloro (>500 ppm). As concentrações de cloro até 100 ppm reduziram as populações de *Salmonella* e *E. coli* O157:H7 em sementes de alfafa, no entanto, as concentrações entre 100 e 1000 ppm não foram mais eficazes. O tratamento de brotos de alfafa mergulhadas por 2 minutos em soluções de cloro de 500 ppm reduziu a população de salmonelas de 3,4 log por grama, e, após o tratamento com 2.000 ppm de cloro, as populações de salmonelas foram indetectáveis (<1 UFC/g). Não foram, no entanto, relatados os aspectos sensoriais do efeito do cloro neste produto ⁽¹⁸⁾.

Estudos mostraram que a redução máxima nas populações de bactérias patogénicas humanas em maçãs, tomates e alface foi de 2,3 log UFC/cm² após a imersão em soluções de cloro de 2000 ppm durante 1 minuto. As populações de *Shigella sonnei* inoculadas em folhas de salsa inteiras foram reduzidas em mais de 7 log UFC/g após um tratamento durante 5 minutos com 250 ppm de cloro livre. Também as populações de *E. coli* inoculadas em superfícies de laranja foram reduzidas em mais de 2 log UFC/cm² após imersão em soluções de 200

ppm de cloro a 30°C durante 8 minutos. Esta redução foi apenas ligeiramente superior à que resultou da imersão em água desionizada simples ⁽¹⁸⁾.

O que se verifica é, de facto, uma grande variação nos resultados o que poderá indicar que estes tratamentos não são eficazes de forma uniforme existindo um leque variado de factores influenciadores do processo. Além disso, pequenas fendas, rachaduras e fissuras existentes nos alimentos, juntamente com a natureza hidrofóbica da cutícula cerosa na superfície de muitas frutas e verduras, podem evitar que o cloro ou outros desinfectantes consigam alcançar os microrganismos e eliminá-los.

O dicloroisocianurato de sódio é o principal constituinte das “pastilhas de cloro” efervescentes utilizadas diariamente nas diferentes unidades de Restauração Colectiva. Num estudo em que este composto foi administrado a ratos fêmea entre os dias 6 e 15 de gestação e em doses de 0, 25, 100 ou 400 mg/kg de peso corporal por dia, foi observada cerca de 50% de mortalidade nos animais que receberam a dose mais elevada, assim como se verificou uma redução do peso corporal nos sobreviventes. Não havia sinais de toxicidade no feto, no entanto, verificou-se um atraso na ossificação, tendo sido observada toxicidade materna no grupo que recebeu a dose mais elevada ⁽¹²⁾.

2. Dióxido de cloro e clorito de sódio acidificado.

As principais vantagens do dióxido de cloro (ClO_2) sobre o ácido hipocloroso (HOCl) incluem uma reduzida reactividade com a matéria orgânica e uma maior actividade em pH neutro, no entanto, a estabilidade do dióxido de cloro pode ser um problema. O ClO_2 forma menos compostos orgânicos halogenados do que o HOCl , embora o seu poder oxidante seja referido como 2,5 vezes maior

do que o cloro. A sua utilização é permitida nos EUA e num máximo de 200 ppm de ClO_2 para a higienização de equipamentos e de apenas 3 ppm de concentração máxima admissível para o contacto com os produtos inteiros, no entanto, este valor diminui para 1 ppm no caso das batatas descascadas. Não é autorizada a sua utilização para produtos minimamente processados. O tratamento de produtos com ClO_2 tem de ser seguido por uma lavagem com água potável ^(8, 12).

Há menos informações sobre a eficácia do ClO_2 do que do HOCl como desinfectantes para os produtos alimentares. Tal como acontece com o HOCl, a susceptibilidade microbiana ao ClO_2 difere com a estirpe e com as condições ambientais da aplicação. A população de *L. monocytogenes* inoculada em alface desfiada e folhas de couve foi reduzida em 1,1 e 0,8 log em 4 e 22°C, respectivamente, após o tratamento com uma solução de 5 ppm de ClO_2 durante 10 minutos quando comparado com a lavagem em água da torneira ⁽²⁴⁾. A utilização do gás de ClO_2 reduziu o número de *E. coli* O157:H7 em superfícies de pimentos danificados. Este tratamento, com soluções desinfectantes de concentrações de 0,6 e 1,2 ppm de gás ClO_2 , reduziu as populações de *E. coli* O157:H7 em 3,0 e 6,4 ciclos log, respectivamente. Os mesmos autores não observaram um crescimento significativo de *E. coli* O157:H7 nos pimentos com superfícies ilesas, mas pelo contrário constataram um crescimento significativo nos pimentos que apresentavam a superfície danificada, no período de 24 horas a 37°C. O uso de ClO_2 no estado gasoso, em oposição à solução aquosa, requer um estudo adicional ⁽⁷⁰⁾.

A imersão de laranjas em soluções de 100 ppm de dióxido de cloro a 30°C durante 8 minutos produziu uma redução de 3 log de *E. coli* não patogénica, em

comparação com cerca de uma redução de 2 log quando imersas apenas em água desionizada ⁽¹²⁾. A real eficácia deste composto na redução da carga microbiana dos produtos hortícolas merece, pois, mais investigação, uma vez que estudos sugerem que são necessárias concentrações mais elevadas para uma eficácia significativa da acção deste composto ⁽⁸⁾.

O clorito de sódio acidificado (CSA) foi aprovado, nos Estados Unidos da América pela FDA, para utilização num determinado tipo de carnes, nomeadamente aves, mariscos, frutas e legumes crus, quer em forma de *spray*, quer em solução para imersão na concentração entre 500 e 1200 ppm. Este composto é formado através de uma reacção entre clorito de sódio (NaClO_2) e ácido cítrico numa solução aquosa ⁽¹⁵⁾, apresentando uma actividade de amplo espectro germicida. Ruiz-Cruz *et al* demonstraram a eficácia da utilização de CSA na desinfecção de cenoura, sobre as populações de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*, que se traduziu numa redução entre 1 e 2,5 log UFC/g, dependendo da concentração utilizada, isto é, entre 100 e 500 ppm ⁽¹⁵⁾. Um estudo que envolveu a avaliação da acção antimicrobiana contra as mesmas três bactérias em vegetais folhosos verificou que os melhores resultados surgiram com o uso de uma solução de CSA, comparativamente com a utilização de uma solução de cloro ⁽⁷¹⁾. O tratamento de couve chinesa com CSA durante 15 minutos reduziu significativamente o número de microrganismos patogénicos sem, aparentemente, provocar alterações na cor. A população bacteriana natural deste produto foi reduzida em cerca de 2 log UFC/g após a desinfecção com CSA, apresentando resultados significativamente melhores quando comparados com os resultados obtidos com o controlo, onde foi utilizada água destilada ⁽⁷²⁾.

Há, no entanto, a necessidade de mais publicações com informações sobre a utilidade geral do clorito de sódio acidificado na desinfecção de produtos alimentares.

3. Ozono

O tratamento de água potável com ozono, com o objectivo de eliminar os microrganismos, tem sido praticada há quase um século. A *Salmonella Typhimurium*, *Y. enterocolitica*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* estão entre as bactérias patogénicas sensíveis ao tratamento em água ozonizada (20 ppm), assim como os vírus entéricos e os oocistos de protozoários, como *Cryptosporidium parvum* também são sensíveis ao ozono. Foi alcançada uma grande inactivação de 90% de *C. parvum* pelo tratamento soluções de 1 ppm de ozono durante 5 minutos ⁽¹²⁾.

A utilização do ozono nos alimentos foi aprovada na Europa e nos Estados Unidos da América, tendo sido investigado o uso deste produto na desinfecção de diferentes tipos de alimentos, nomeadamente na preservação de peixes, na redução das populações microbianas em aves e na redução das populações microbianas em bacon, carne, manteiga, queijo, ovos, cogumelos, batatas e frutas ⁽⁸⁾. Após o tratamento com ozono de alfaces inoculadas com *Shigella sonnei* foi obtida uma redução de 1,4 log e de 1,8 log após imersão neste produto durante 5 minutos e em concentrações de 2 e de 5 ppm, respectivamente ⁽⁷³⁾.

O aumento do tempo de prateleira de diversos produtos como, laranjas, morangos, framboesas, uvas, maçãs e pêras pode também ser alcançado pelo tratamento com água ozonizada. Além dos efeitos antimicrobianos do ozono, ocorre ainda a oxidação de etileno e retardando, desta forma, os processos

metabólicos relacionados com o amadurecimento. Concentrações de soluções de ozono na faixa dos 2-3 ppm, para a desinfecção de bagas e de 40 ppm para as laranjas reduziram consideravelmente as populações microbianas iniciais destes produtos ^(12, 18).

Devido à sua instabilidade, o ozono precisa de ser gerado no local de uso. Os manipuladores destes produtos também devem estar cientes de que, por causa do forte poder oxidante do ozono, o metal e outros tipos de superfícies com as quais entra em contacto estão sujeitas à corrosão ou a outra alteração. A taxa de deterioração depende da concentração de ozono. No entanto, os equipamentos que utilizam água de lavagem ozonizada no sector das frutas e produtos hortícolas durante as etapas de manuseamento e nas operações de tratamento fornecem um método para controlar a acumulação microbiana, particularmente em águas recicladas, e merece ainda a consideração para o uso rotineiro como um desinfectante para frutas e legumes ⁽¹²⁾. De notar que a maioria dos estudos se concentraram na eficácia antimicrobiana do ozono e pouco foi referido acerca do efeito do ozono nos constituintes nutricionais e na qualidade sensorial dos produtos ⁽⁸⁾.

4. Compostos ácidos

Os ácidos orgânicos são frequentemente utilizados como acidulantes antimicrobianos para preservar os alimentos, quer por adição directa, quer através de fermentação microbiológica. A acidificação pode prevenir a proliferação microbiana, uma vez que muitos patogénios geralmente não conseguem crescer a valores de pH muito abaixo de 4,5. Os ácidos orgânicos podem também possuir capacidades bactericidas. A acção antimicrobiana dos ácidos orgânicos é devida

à redução do pH no ambiente, ruptura do transporte de membrana e/ou permeabilidade, acumulação de aniões, ou uma redução do pH celular interno através da dissociação dos iões de hidrogénio a partir do ácido. Muitos tipos de produtos, especialmente as frutas, possuem naturalmente concentrações significativas de compostos ácidos orgânicos como o ácido acético, benzóico, cítrico, málico, sórbico, succínio, e o ácido tartárico, que afectam negativamente a viabilidade de contaminação por bactérias. As frutas como o melão e o mamão contêm uma menor concentração de ácidos orgânicos comparativamente com outras frutas e, portanto, possuem valores de pH acima de 5,0 o que não suprime o crescimento de bactérias patogénicas ⁽⁸⁾.

Em contraste com o seu uso como conservantes, os ácidos orgânicos, principalmente o ácido láctico, são também utilizadas com sucesso como sanitizantes em carcaças de animais e podem ter um potencial de aplicação para produzir as superfícies dos alimentos, com a finalidade de reduzir as populações de microrganismos ⁽¹²⁾.

Foi pesquisado o uso de ácido acético para inactivar bactérias patogénicas em salsa fresca. Neste estudo, as populações de *Y. enterocolitica* inoculada em folhas de salsa foram reduzidas em mais de 7 ciclos log após a lavagem durante 15 minutos em soluções de 2% em ácido acético ou 40% de vinagre. O tratamento com 5% de ácido acético durante um período de 30 minutos não apresentou nos resultados nenhuma bactéria aeróbia, enquanto o tratamento com vinagre (7,6% de ácido acético) revelou uma redução de 3-6 log da contagem de aeróbios, dependendo da concentração de vinagre e do tempo de exposição. O tratamento de salsa inteira durante 5 min a 21°C com vinagre reduziu as populações de *S. sonnei* em mais de 7 log por grama ⁽⁷⁴⁾. O vinagre e o

sumo de limão apresentam vantagens no facto de serem baratos, assim como simples desinfectantes domésticos, porém os possíveis efeitos negativos a nível sensorial podem revelar-se como uma desvantagem ⁽¹²⁾.

Várias combinações de ácido acético, ácido láctico e cloro foram observadas a reduzir as populações de *L. monocytogenes* em alface desfiada. O ácido láctico em combinação com uma solução de cloro de 100 ppm foi mais eficaz na redução dos níveis de *L. monocytogenes* do que o ácido láctico ou o cloro sozinho, no entanto, o antagonismo aumentado pode ser devido a um efeito de adição dos compostos combinados ou devido a um aumento no ácido hipocloroso na redução dos níveis de pH das combinações dos ácidos ⁽²⁴⁾.

A imersão durante 2 minutos numa solução de 5% de ácido acético, à temperatura ambiente, foi o tratamento mais eficaz entre vários estudados para a redução das populações de *E. coli* O157:H7 inoculada em superfícies de maçã. O tratamento com 5% de ácido acético reduziu a população microbiana em mais de 3 log UFC/cm², em comparação com uma redução menor do que 3 log após a utilização de uma preparação comercial com 80 ppm de ácido peroxiacético ⁽¹⁷⁾.

Foi avaliada a acção antimicrobiana de uma solução comercial de vinagre que continha 5% de ácido acético durante 5 minutos, sobre *E. coli* O157:H7 e *Salmonella entérica* serovars Typhimurium inoculadas em alface tendo observado uma redução de 3 log à população inicial, a uma temperatura de 25°C ⁽⁷⁵⁾. A imersão de alface fresca em soluções desinfectantes com 0,5% de ácido cítrico ou 0,5% de ácido láctico durante 2 minutos demonstrou ser tão eficaz como uma solução de 100 ppm de cloro na redução da população microbiana da alface. O uso comercial de soluções de ácidos orgânicos poderá superar os potenciais riscos de cloro contra o meio ambiente e a saúde humana ⁽¹⁴⁾.

5. Ácido peracético

O ácido peracético (AP), também referido como ácido peroxiacético (CH_3COOOH), é uma mistura aquosa de equilíbrio quaternário de ácido acético e peróxido de hidrogénio. Tal como o ozono e o dióxido de cloro, o ácido peracético é efectivo na eliminação de microrganismos patogénicos em suspensão e em menores concentrações do que aquelas que são necessárias aquando da utilização da desinfecção de cloro ⁽⁸⁾.

Apesar da concentração das soluções aprovada para uso na desinfecção de frutas e vegetais ser de até 80 ppm, alguns estudos revelaram que esta concentração não seria suficiente para obter uma redução substancial da carga microbiana inicial dos produtos. Num estudo realizado por Vandekinderen *et al*, apenas foi obtida uma redução de 1.7 log UFC/g na população microbiana de alface minimamente processada usando uma concentração de 80 ppm de AP ⁽⁷⁶⁾. Sabe-se que, quando se utilizam concentrações de 40 e 80 ppm de AP, este desinfectante reduz significativamente ($P \leq 0,05$) as populações de salmonelas e de *E. coli* O157:H7 nas superfícies de melão. No entanto, os mesmos resultados não se verificaram eficazes em espargos ⁽⁸⁾.

A população microbiana das superfícies de laranjas foi reduzida em cerca de 85% após escovar as superfícies em água, seguida de uma imersão numa solução de 200 ppm de AP durante 15 segundos, em comparação com uma redução de 60% nas laranjas que foram esfregadas e mergulhadas em água pura ⁽¹⁸⁾. Os autores de um estudo mais recente analisaram a eficácia antimicrobiana da utilização de uma mistura de ácido peracético (ácido peracético e peróxido de hidrogénio) em aves. De forma a validar a utilização da mistura de AP, foram comparadas duas soluções: uma solução de mistura de AP de 85 ppm e uma de

cloro com uma concentração de 30 ppm, tendo-se constatado uma redução da presença de *Salmonella* em 92% e 57%, respectivamente ⁽⁷⁷⁾.

Apesar de em Portugal e na Europa, ainda não se verificar a homologação do ácido peracético, este produto é actualmente um dos desinfectantes de maior aplicação na indústria de alimentos, devido à sua alta eficácia a frio e à grande diluição dos produtos de degradação, que não oferecem risco de toxicidade nem afectam o sabor e o odor dos alimentos ^(11, 77).

6. Peróxido de hidrogénio

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2), também conhecido de forma comum por água oxigenada, possui uma actividade bactericida e inibitória devido às suas propriedades como oxidante e à sua capacidade de gerar espécies citotóxicas oxidantes, como os radicais hidroxila ⁽⁸⁾.

Nos últimos anos, tem-se investigado a utilização de H_2O_2 em produtos inteiros e de 4ª Gama (preparados pronto a consumir). As populações de *Salmonella* em brotos de alfafa foram reduzidas em aproximadamente 2 log UFC/g depois do tratamento por 2 min com 2% de H_2O_2 ou 200 ppm de cloro ⁽¹⁸⁾. Menos de 1 log UFC/g de redução foi observada após a desinfecção de cubos de melão sob condições de teste semelhante. O tratamento de melões inteiros e espargos com soluções de 1% de H_2O_2 foi menos eficaz na redução dos níveis de salmonelas inoculadas e *E. coli* O157:H7 do que uma solução de hipoclorito, de clorito de sódio acidificado ou de ácido peracético ⁽¹⁸⁾. O uso de um pulverizador com uma solução de 1% de H_2O_2 em sementes e brotos de alfafa não controlou o crescimento de *E. coli* O157:H7. Uma solução de 3% de H_2O_2 , isoladamente ou em combinação com 2 ou 5% de ácido acético, pulverizado no pimento verde,

reduziu a população de *Shigella* em cerca de 5 ciclos logarítmicos, comparado com menos de uma redução de 1-log de pois da utilização de água simples. No mesmo estudo, *Shigella* inoculada em alface foi reduzida em aproximadamente 4 log após imersão em H₂O₂ com uma solução combinada de 2 ou 5% de ácido acético, porém, foram notados defeitos visuais na alface tratada. O tratamento por imersão em solução de H₂O₂ reduziu as populações microbianas do abacaxi, pimentão, pepino e melão e não alterou as características sensoriais. Por outro lado, o tratamento de outros produtos não foi tão bem sucedido, como é o exemplo da alface cortada que foi severamente acastanhada após uma imersão numa solução de H₂O₂. É necessária mais investigação para determinar a utilidade do tratamento com H₂O₂ nouro tipo de frutas e legumes ⁽¹²⁾.

Anexo B – Concentrações de clorofórmio utilizadas na construção das rectas de calibração e respectivos resultados.

Na tabela seguinte (Tabela 8) encontra a gama de concentrações das soluções padrão utilizadas na construção da recta da calibração obtidas com a fibra PDMS e com a fibra PDMS/DVB em duas fases distintas. Para além disso, são apresentados também os limites de detecção e os coeficientes de correlação de cada recta de calibração obtida e descrita ao longo do trabalho.

Tabela 8 – Concentrações de clorofórmio utilizadas nas rectas de calibração, limite de detecção e coeficiente de correlação, respectivos.

	FIBRAS DE SPME UTILIZADAS		
	PDMS	PDMS/DVB (1ªFase)	PDMS/DVB (2ªFase)
Gama de concentrações ($\mu\text{g/L}$)	0,5 - 30	0,01 – 1,5	0,0003 – 0,1
Limite de detecção ($\mu\text{g/L}$)	5,46	0,20	0,01
Coefficiente de correlação (R^2)	0,985	0,992	0,998

Anexo C - Fichas técnicas e de segurança dos produtos de desinfeção.

1. P3 – tsunami 100[®] (ácido peracético)

2. Sanichlor[®] (pastilhas de cloro efervescentes)

3. Mikrochlor liquid® (lixívia)