

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DOS ALIMENTOS**

Vinícius do Amaral Flores

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SANITIZANTES COMERCIAIS E DE UM
FUMÍGENO UTILIZADOS NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO
BACTERIANA DO AMBIENTE EM INDÚSTRIAS ALIMENTÍCIAS**

**Santa Maria, RS
2019**

Vinícius do Amaral Flores

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SANITIZANTES COMERCIAIS E DE UM FUMÍGENO UTILIZADOS NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DO AMBIENTE EM INDÚSTRIAS ALIMENTÍCIAS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards

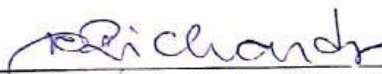
Santa Maria, RS
2019

Vinícius do Amaral Flores

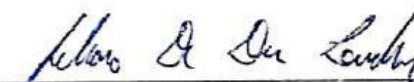
AValiação da Eficiência de Sanitizantes Comerciais e de um Fumígeno Utilizados no Controle da Contaminação Bacteriana do Ambiente em Indústrias Alimentícias

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovado em 25 março de 2019:



Neila Sílvia Pereira dos Santos Richards, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Juliano De Dea Lindner, Ph.D. (UFSC)



Mari Sílvia Rodrigues de Oliveira, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2019

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SANITIZANTES COMERCIAIS E DE UM FUMÍGENO UTILIZADOS NO CONTROLE DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA DO AMBIENTE EM INDÚSTRIAS ALIMENTÍCIAS

Autor: Vinícius do Amaral Flores

Orientadora: Neila Silvia Pereira dos Santos Richards

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) constituem um grande problema de saúde pública, tanto no Brasil como nos demais países, sendo responsáveis por elevados custos econômicos e sociais. Neste contexto, faz-se necessário para a indústria alimentícia a investigação por novos materiais, métodos e tecnologias, que irão facilitar a higienização, visando uma maior segurança e controle de qualidade dos produtos. Algumas características são consideradas extremamente relevantes para o uso e aplicação de um desinfetante; possuir um amplo espectro de ação; serem ativos na presença de matéria orgânica; possuírem baixa toxicidade; serem inodoros ou de odor agradável; estáveis à temperatura ambiente; econômicos; não poluentes; estáveis em concentração original ou quando diluídos. A partir disto, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de três sanitizantes comerciais e um fumígeno na eliminação de cepas de referência de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*; *Escherichia coli*; *Enterococcus hirae*; *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Listeria monocytogenes* e sua potencial aplicação em indústrias alimentícias. Para determinar a eficácia dos desinfetantes comerciais, utilizou-se produtos à base de ácido peracético, hipoclorito de sódio e quaternário de amônia em diferentes concentrações, baseados na metodologia do Comitê Europeu de Normalização, para testes em superfície não porosa. Através da Norma Francesa NFT 72281 para avaliação de desinfetantes difundidos pelo ar, testou-se um desinfetante fumigante a base de ortofenilfenol (OPP).

Foi possível observar que alguns micro-organismos são mais resistentes diante a exposição a determinados princípios ativos dos sanitizantes comerciais e do fumígeno. Portanto, é relevante testar previamente o micro-organismo alvo, para direcionar o desinfetante e as concentrações apropriadas para seu controle.

Palavras-chave: desinfecção, bactéria, saneantes, fumaça.

ABSTRACT

Masters Dissertation

Postgraduate Program in Food Science and Technology

Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF COMMERCIAL SANITIZERS AND A FUMIGENE USED IN THE CONTROL OF BACTERIAL CONTAMINATION OF THE ENVIRONMENT IN FOOD INDUSTRIES

Author: Vinícius do Amaral Flores

Advisor: Neila Silvia Pereira dos Santos Richards

Foodborne diseases are a major public health problem, both in Brazil and in other countries, and are responsible for high economic and social costs. In this context, it is necessary for the food industry to investigate new materials, methods and technologies, which will facilitate hygiene, aiming at greater safety and quality control of products. Some characteristics are considered extremely relevant for the use and application of a disinfectant; it must have a broad spectrum of action; are active in the presence of organic matter; have low toxicity; odorless or odor-free; stable at room temperature; low cost; non-polluting; stable in their original concentration or when diluted. From this, the objective of this work was to evaluate the efficiency of three commercial sanitizers and a fumigant in the elimination of reference strains of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*; *Escherichia coli*; *Enterococcus hirae*; *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes* and their potential application in the food industry. To determine the efficacy of commercial sanitizers, products based on peracetic acid, sodium hypochlorite and quaternary ammonia were used in different concentrations, based on the methodology of the European Committee for Standardization, for non-porous surface tests. Through French Standard NFT 72281 for evaluation of airborne disinfectants, a fumigant disinfectant based on

orthophenylphenol (OPP) was tested. It has been observed that some microorganisms are more resistant to exposure to certain active principles of commercial sanitizers and fumigants. Therefore, it is important to test previously the target microorganism to direct the disinfectant and the appropriate concentrations for their control.

Key-words: disinfection, bacteria, sanitizers, smoke.

LISTA DE FIGURAS

Manuscrito I

Figura 1: Esquema para teste da eficácia bactericida do fumígeno de acordo com o padrão estabelecido pela Norma Francesa NFT 72281 (AFNOR, 2014)39

Figura 2: Redução bacteriana após exposição ao fumígeno com Ortofenilfenol (OPP) 40

Manuscrito II

Figura 1: Esquema para teste da eficácia bactericida dos sanitizantes de acordo com o padrão estabelecido pelo Comitê Europeu de Padronização (CEN) (European Standard 13697, 2001).....59

Figura 2: Eficácia do sanitizante ácido peracético contra bactérias patogênicas60

Figura 3: Eficácia do sanitizante hipoclorito de sódio contra bactérias patogênicas.....60

Figura 4: Eficácia do sanitizante quaternário de amônia contra bactérias patogênicas . 61

LISTA DE TABELAS

Manuscrito II

| | |
|--|----|
| Tabela 1: Sanitizantes permitidos para utilização na indústria de alimentos, concentrações recomendadas e respectivos neutralizantes | 58 |
|--|----|

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 8 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 10 |
| 2.1 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) | 10 |
| 2.2 Patógenos associados as DTA´s..... | 11 |
| 2.2.1 <i>Salmonella enteritidis</i> serovar <i>typhimurium</i> | 11 |
| 2.2.2 <i>Escherichia coli</i>..... | 12 |
| 2.2.3 <i>Enterococcus hirae</i>..... | 12 |
| 2.2.4 <i>Staphylococcus aureus</i> | 13 |
| 2.2.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>..... | 14 |
| 2.2.6 <i>Listeria monocytogenes</i> | 14 |
| 2.3 Higienização em ambientes de processamento de alimentos | 14 |
| 2.3.2 Etapas da Higienização | 15 |
| 2.3.2.1 Etapa Preliminar | 15 |
| 2.3.2.2 Pré-Lavagem..... | 16 |
| 2.3.2.3 Limpeza com Detergentes | 16 |
| 2.3.2.4 Enxágüe | 17 |
| 2.3.2.5 Sanitização | 17 |
| 2.4 Sanitizantes..... | 18 |
| 2.4.1 Compostos Fenólicos | 18 |
| 2.4.2 Hipoclorito de Sódio..... | 19 |
| 2.4.3 Ácido Peracético | 19 |
| 2.4.4 Compostos com Quaternário de amônia (QAT)..... | 20 |
| 2.4.5 Eficiência dos Sanitizantes | 21 |
| 3 OBJETIVOS | 23 |
| 3.1 Objetivo principal | 23 |
| 3.2 Objetivos específicos | 23 |

| | |
|--------------------------------|-----------|
| 4 MANUSCRITOS..... | 24 |
| 4.1 MANUSCRITO I | 24 |
| 4.2 MANUSCRITO II..... | 41 |
| 5. CONCLUSÃO FINAL..... | 62 |
| REFERÊNCIAS | 63 |

1. INTRODUÇÃO

As doenças transmitidas por alimentos (DTAs) constituem um grande problema de saúde pública, tanto no Brasil como nos demais países, sendo responsáveis por elevados custos econômicos e sociais. São causadas por agentes etiológicos, principalmente micro-organismos, os quais chegam no organismo humano através da ingestão de água e alimentos contaminados (JUNG et al., 2012; AMSON et al., 2006).

O impacto econômico negativo causado pelas DTAs alcança níveis cada vez mais preocupantes, acarretando grandes perdas para as indústrias, o turismo e a sociedade (NASCIMENTO, 2000). No Brasil, de 2009 a 2018, foram notificados 6.809 mil surtos de DTA, envolvendo 120.584 mil pessoas doentes. Dentre os agentes etiológicos mais frequentes, a *Escherichia coli* foi identificada como sendo a causadora de 23,4% dos casos identificados, seguido pela *Salmonella* spp., 11,3%, e *Staphylococcus aureus* 9,4% (BRASIL, 2018). *Salmonella* spp. é uma bactéria entérica responsável por sérios problemas de saúde pública e significativas perdas econômicas, sendo reconhecida como um dos principais agentes de infecção alimentar em diversos países (MAIJALA, 2005).

As primeiras evidências da ocorrência de infecção causada por *E.coli* pertencente ao sorotipo O157:H7 surgiram com a descrição de dois surtos ocorridos nos Estados Unidos, nos estados de Oregon e Michigan, em 1982, com 47 casos associados à ingestão de hambúrgueres de uma mesma rede de lanchonetes. Anteriormente, uma única cepa de *E.coli* O157:H7 havia sido isolada pelo “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) em 1975, de um total de 3.000 cepas de *E.coli* sorotipadas desde 1973 (RILEY et al., 1983).

Em 1996, além do Japão, a Escócia foi palco de surtos de origem alimentar por *E.coli* O157:H7, um dos quais por consumo de torta de carne, com pelo menos 415 casos, incluindo 18 óbitos, e outro, por leite, com 100 pessoas envolvidas (AHMED, 1997; REILLY & CARTER, 1997).

No surto ocorrido em uma penitenciária do sistema prisional da Espanha, Hernando et al. (2007) isolaram *C. perfringens*, *B. cereus* e *E. coli* em salpicão à base de mariscos, com populações acima do estabelecido pela legislação espanhola. O surto ocorreu provavelmente devido ao armazenamento incorreto dos alimentos após o cozimento, uma vez que esses micro-organismos podem ser facilmente destruídos com aquecimento adequado antes de a refeição ser servida. A presença de *E. coli* e coliformes totais indicaram que não houve boas práticas de higiene na manipulação dos alimentos.

Estudos mostram que a correta e estrita higienização de instalações, equipamentos, móveis e utensílios, que são os principais veículos de contaminação cruzada de *Salmonella*, minimizam esse risco presente em indústrias alimentícias (FLEETWOOD et al., 2019). Dessa forma, têm sido estudados métodos de desinfecção que apresentam resultados positivos na eliminação de micro-organismos. Segundo a Portaria nº 101 de 11 de agosto de 1993, do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA: o termo desinfetante é comumente empregado para designar substâncias capazes de destruir micro-organismos patogênicos não esporulados em curto espaço de tempo, quando aplicado a objetos inanimados. Sanitizantes são desinfetantes que reduzem o número de micro-organismos a níveis considerados seguros para a saúde pública, porém como a grande maioria dos produtos comercializados encontra-se rotulado como "desinfetante" qualquer micro-organismo patogênico que se mostrar resistente ao desinfetante na maior diluição recomendada pelo fabricante é motivo de reprovação (BRASIL, 1993).

De acordo com Evangelista (2000), o primeiro ponto a ser levantado e que é de fundamental importância a aplicação de programas de higienização dentro das indústrias de alimentos. Os sanitizantes utilizados para a limpeza devem ser adquiridos não só por sua eficiência na remoção de sujidades, como também pelo seu efeito sobre os equipamentos, superfícies, tratabilidade dos efluentes industriais gerados e também sobre os operadores. Para uma limpeza eficiente é imprescindível saber a concentração, temperatura, tempo de exposição e ação mecânica adequada de cada sanitizante.

Algumas características são consideradas extremamente relevantes para o uso e aplicação de um desinfetante. Esses produtos devem possuir um amplo espectro de ação; serem ativos na presença de matéria orgânica; compatíveis com sabões, detergentes e outros produtos químicos; possuírem baixa toxicidade; serem compatíveis com diversos tipos de materiais (não serem corrosivos em superfícies metálicas e não

devem causar deterioração de borrachas, plásticos e outros materiais); serem inodoros ou de odor agradável; estáveis à temperatura ambiente; econômicos; não poluentes; estáveis em concentração original ou quando diluídos (BLOCK, 2001). Assim, para um processo de desinfecção eficaz, é necessário levar em consideração uma série de fatores relacionados ao produto a ser utilizado (concentração, tempo de exposição), ao local onde será aplicado (presença de matéria orgânica, acesso do produto) e aos micro-organismos presentes (carga microbiana, tipo de micro-organismo) (KUAYE, 2017).

Neste contexto, faz-se necessário para a indústria alimentícia a investigação por novos materiais, métodos e tecnologias, que irão facilitar a higienização, visando uma maior segurança e controle de qualidade dos produtos produzidos. A partir disto, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência de três sanitizantes comerciais e um fumígeno na eliminação de cepas de referência de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Enterococcus hirae* (ATCC 8043), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 35152) e sua potencial aplicação em indústrias alimentícias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças transmitidas por alimentos (DTA)

As doenças transmitidas por alimentos abrangem um amplo espectro de enfermidades, e são um problema público de saúde a nível mundial, as quais podem apresentar-se através de sintomas comuns como diarreias, mas também como deficiências renais e hepática (Organização Mundial da Saúde, 2015). Derivam-se da ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos patogênicos, parasitas, toxinas naturais, e químicos, através da contaminação cruzada dentro do ambiente de processamento no momento da produção ou manipulação, e podem provocar irritações ou infecções no trato gastrointestinal (NIH, 2012). Cada ano, as DTA's atingem pelo menos 1 de 10 pessoas, afetando entorno de 33 milhões de pessoas a nível mundial. Nos países desenvolvidos, entre 20-40% das desordens gastrointestinais estão associados a patógenos presentes em alimentos, concentrando-se em 75% das mortes por DTA's nas

regiões do sudeste asiático e África, e em menor grau, na região da Europa (SHARIF; JAVED; NASIR, 2018; OMS, 2015).

22 Patógenos comuns na indústria de alimentos

A exposição de matérias primas para produção de alimentos em superfícies e ambientes com deficiente higiene origina, inevitavelmente, contaminação com patógenos que podem provocar as DTA's no consumidor. A presença de biofilmes bacterianos nesses ambientes é uma preocupação recorrente para a indústria de alimentos, principalmente por causa da sua forte tolerância antimicrobiana. A limitação da penetração do agente, o desenvolvimento de múltiplos fenótipos e a existência de células inativas, bem como as diferentes reatividades dos agentes antimicrobianos, são fatores que influenciam a tolerância do biofilme aos sanitizantes (KIM et al., 2008). Apesar das melhorias no *layout* das plantas, desenho dos equipamentos, e nos procedimentos de limpeza e sanitização, o fenômeno dos biofilmes na indústria alimentícia ainda é pouco compreendido e controlado (LIU et al., 2015).

A Administração de Alimentos e Drogas (FDA, siglas em inglês) dos Estados Unidos publicou uma lista de micro-organismos com maior vinculação às DTA's, entre eles: *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Clyclospora cayetanensis*, *Escherichia coli* (produtora de toxina), *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Shiguella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*, (FDA, 2019).

2.2.1 *Salmonella enteritidis* serovar *typhimurium*

O gênero *Salmonella*, pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, foi descrito pela primeira vez em 1885 por Daniel Elmer Salmo. Caracterizaram-se por serem bastonetes curtos, gram-negativos, anaeróbio facultativo, sem cápsula, não formador de esporos, imóvel ou móvel com flagelos peritríquios. Mesófilos capazes de crescerem entre, 5 °C – 45 °C, apresentando temperatura ótima de crescimento de 37 °C. Crescem em pH entre 4 – 9, sendo 7 o pH ideal. São micro-organismos fermentadores de L-

rhamnose, L-arabinose, D-sorbitol, D-manitol, D-manose, D-xilose, maltose e trealose, porém, não fermentam lactose e sacarose (GAST, 2008). A *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* é capaz de infectar um amplo número de hospedeiros (roedores, animais domésticos e humanos), considerada um dos agentes causadores das gastroenterites (GARMORY et al., 2002). A presença de *Salmonella* em alimentos representa uma preocupação de saúde humana internacionalmente reconhecida.

Os alimentos que não são submetidos a tratamento letal no final do processamento ou que não recebem tratamento adicional em casa merecem atenção especial. Os episódios de contaminação cruzada e recontaminação de *Salmonella* tem sido relacionados aos seguintes fatores: más práticas de saneamento, desenho deficiente do equipamento e controle deficiente dos ingredientes (CARRASCO, 2012). Uma alternativa para a prevenção de surtos de *Salmonella* devido ao consumo de carne e produtos avícolas, é utilização dos ácidos orgânicos (acético, cítrico, láctico, málico, propiônico e tartárico entre outros) (MANI-LÓPEZ, 2012).

2.2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete, que é freqüentemente móvel com flagelos (BELOIN et al., 2008). Ainda como característica geral desta família, observa-se a capacidade de metabolizar uma variedade de substâncias como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios e ácidos orgânicos. Essas propriedades metabólicas são de grande importância e extensivamente utilizadas para classificar e identificar gêneros e espécies desta família.

Amostras típicas da espécie fermentam a lactose, com produção de ácido e gás, produzem ácido a partir da glicose revelando resultado positivo na prova de vermelho de metila (VM), e não produzem acetoina através da metabolização da glicose, revelando resultado negativo para a prova de Voges-Proskauer (VP), não utilizam citrato, não produzem H₂S e produzem indol a partir do triptofano (TRABULSI et al., 2004). De modo geral, essa bactéria é considerada um comensal inofensivo, no entanto, diversos sorovares dessa espécie apresentam potencial patogênico (NATARO et al., 2006). Esse organismo, em especial, apresenta uma diversidade patogênica extraordinária compreendendo numerosos grupos e sorotipos, sendo capaz de causar infecções intestinais e extra-intestinais por diferentes mecanismos, assim como infecção do trato urinário e meningites (TRABULSI et al., 2004).

2.2.3 *Enterococcus hirae*

Os micro-organismos pertencentes a este gênero são cocos gram-positivos, podendo apresentar-se isoladamente, aos pares ou em pequenas cadeias, são catalase negativos e não formam esporos. Embora cresçam em presença de oxigênio, são incapazes de sintetizar o composto heme e, portanto, não possuem metabolismo respiratório, são anaeróbios facultativos, e capazes de crescer em condições bastante variadas de temperatura (10 – 45 °C) e de pH (5,0 - 9,6) (FACKLAM et al., 1999).

São capazes de hidrolisar a esculina na presença de sais biliares, geralmente toleram altas concentrações de NaCl (6,5%) e possuem o antígeno D de Lancefield, com algumas exceções (FACKLAM et al., 1989; DEVRIESE et al., 1990; COLLINS et al., 1991). Uma característica importante deste gênero é a produção das enzimas pirrolidonilarilamidase (PYRase) e leucina aminopeptidase (LAPase), embora ocorram exceções em algumas espécies. Possuem metabolismo homofermentativo, pois produzem ácido lático como produto final do metabolismo da glicose, sem produção de gás (TEIXEIRA et al., 2003).

2.2.4 *Staphylococcus aureus*

Membros do gênero *Staphylococcus* apresentam-se como cocos gram-positivos, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, isoladamente, aos pares, em tétrades, em pequenas cadeias (3 ou 4 células) ou irregulares, na forma de cachos. Esses micro-organismos são imóveis, resistentes à bacitracina, não formam esporos, são anaeróbios facultativos, normalmente, produzem a enzima catalase, são capazes de crescer em até 10% de NaCl e sua temperatura ótima de crescimento se encontra entre 30 °C e 37 °C. Pertencem à família *Staphylococcaceae* e em seu genoma apresentam baixo conteúdo G-C (HOLT et al., 1994; BANNERMAN & PEACOCK, 2007). O gênero *Staphylococcus* é composto por 41 espécies e 24 subespécies (EUZEBY, 2008). Essas espécies estão amplamente distribuídas na natureza e colonizam, principalmente, mucosas, pele e glândulas da pele de mamíferos e aves (JARLOV, 1999).

Baseado na capacidade de coagular o plasma, através da ação da enzima coagulase, as espécies do gênero são classificadas em coagulase-positivas e coagulase-negativas. A espécie *S. aureus* subespécie aureus (referida apenas como *S. aureus*) é a principal representante do grupo das espécies coagulase-positivas. Essa espécie é

reconhecida desde 1883 como agente de infecções, tendo sido responsável, nessa era pré-antibiótico, por taxas de mortalidade em bacteriemias de até 82% (SMITH & JARVIS, 1999).

2.2.5 *Pseudomonas aeruginosa*

A *Pseudomonas aeruginosa* é um organismo gram-negativo em forma de bastonetes e inclui bastonetes retos ou ligeiramente curvos, com 0,5 a 1,0 µm de largura e 1,5 a 5,0 µm de comprimento. A sua mobilidade é assegurada por um ou vários flagelos polares. As *Pseudomonas* podem ser pesquisadas nas águas subterrâneas ou de consumo, nas águas de piscinas ou nas águas minerais, contando-se entre os organismos patogênicos cuja identificação se afigura mais interessante. A *Pseudomonas aeruginosa* é produtora de piocianina com capacidade para se desenvolver em meio de cultura contendo cetrimida. É oxidase e catalase positiva, fluorescente em luz ultravioleta (MENDES; OLIVEIRA, 2004).

2.2.6 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes possui forma de bastonetes, anaeróbica facultativa, gram-positiva, que cresce entre -0,4 e 50 °C. É catalase positiva e oxidase negativa e expressa uma P-hemolisina que produz zonas de limpeza em ágar sangue (FARBER; PETERKIN, 1991). É um patógeno intracelular onipresente, que tem sido implicado na última década como o organismo causador de vários surtos de doenças transmitidas por alimentos. A listeriose, com uma taxa de mortalidade de cerca de 24%, é encontrada principalmente entre mulheres grávidas, seus fetos e pessoas imuno-comprometidas, com sintomas de aborto, morte neonatal, septicemia e meningite. Investigações epidemiológicas podem fazer uso de procedimentos de tipagem de tensão, como análise de enzimas de restrição de DNA ou tipagem eletroforética de enzimas (NALÉRIO et al., 2009).

23 Higienização em ambientes de processamento de alimentos

O objetivo de um programa de higienização ou saneamento é fornecer um ambiente limpo e higiênico para o manuseio de produtos alimentícios. Este programa deve fornecer limpeza e higienização de todos os equipamentos de manipulação de alimentos e de cada área da instalação em tempo hábil. É essencial que esse programa seja projetado para atingir esse objetivo e permaneça economicamente viável, atendendo ou excedendo todos os requisitos regulatórios (BRENT, 2006).

As etapas de um programa de higienização que normalmente são propostas para o controle higiênico de superfícies de equipamentos e utensílios, levam em consideração as características de solubilidade dos resíduos de alimentos em água ou detergentes alcalinos e ácidos. A água, associada à ação mecânica, é capaz de remover com alguma facilidade resíduos de carboidratos e sais minerais monovalentes, desde que não tenham sofrido ação do calor. No entanto, verifica-se a necessidade do uso de agentes alcalinos ou de tensoativos para a remoção de gordura e de ácidos para a remoção de sais minerais divalentes, como o cálcio e magnésio. Os alcalinos também são os agentes responsáveis pela remoção de resíduos de proteína. Deve-se salientar que a ação do calor torna mais difícil a remoção dos resíduos (ANDRADE, 2008).

2.3.1 Etapas da Higienização

A higienização de superfície, do ponto de vista conceitual, divide-se em duas etapas distintas: Limpeza e sanitização (ou sanificação). Na limpeza, objetiva-se a remoção de resíduos orgânicos. Na sanitização, procura-se eliminar micro-organismos patogênicos/deteriorantes a níveis que não comprometam a qualidade higiênico-sanitária do alimento (BRASIL, 2004).

Germano e Germano, (2003) dizem ainda que:

“Uma higienização eficiente surge da interrelação entre as energias química, mecânica e térmica, além do tempo de duração do procedimento. Em princípio, quanto maior a tempo de contato ou duração do procedimento, mais eficiente será a higienização...”

Rêgo e Faro (2003) subdividiram as duas etapas limpeza e sanitização em sete procedimentos, sendo repartido em: i) etapa preliminar; ii) pré lavagem; iii) lavagem com detergente e; iv) enxágüe. Sanitização divide-se em: i) aplicação do sanitizantes; ii) enxágüe final e; iii) etapas finais.

2.3.2.1 Etapa Preliminar

A etapa preliminar pode envolver a colocação das partes removíveis e menores do equipamento em água, para umedecer os resíduos e remover os menos aderentes. Pode-se empregar escovas ou raspadores rígidos o bastante para despregar os resíduos, mas não tanto a ponto de danificar a superfície a ser limpa. Abrasivos como lãs de aço ou escovas metálicas não devem ser utilizados, pois riscam o equipamento e podem deixar partículas que podem gerar perigo físico para o alimento (RÊGO; FARO, 2003).

Jatos de água devem ser usados com cuidado para evitar que a sujeira deslocada não se espalhe pelo ambiente. A temperatura ideal da água para esse procedimento é em torno de 40 °C, pois quando excessivamente quente desnatura proteínas, enquanto que fria pode provocar a solidificação das gorduras. Recomenda-se que a temperatura mínima deva estar 5 °C acima do ponto de liquefação de gorduras e a temperatura máxima dependerá do ponto de desnaturação da proteína constituinte do alimento. A ação mecânica da água é responsável pela remoção de resíduos não solúveis e diminuição da carga microbiana das superfícies (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.3.2.2 Pré-Lavagem

Visa à redução da quantidade de resíduos presentes nas superfícies dos equipamentos e utensílios utilizando-se apenas de água. Este processo remove cerca de 90% dos resíduos solúveis em água (STOICA, 2018).

2.3.2.3 Limpeza com Detergentes

Caracteriza-se pelo uso de detergentes em contato direto com as sujidades que tem como objetivo separá-las das superfícies a serem higienizadas, dispersá-las no solvente e prevenir nova deposição sobre as superfícies. É a operação mais importante, e seu sucesso depende de se conhecer bem as características do detergente e de respeitar as condições de seu emprego. É importante conhecer: i) as funções dos agentes de limpeza, como alcalinos, ácidos, tensoativos; ii) as reações físicas e, ou, químicas entre os resíduos e os detergentes durante o procedimento de higienização, como

saponificação, emulsificação, molhagem, penetração, suspensão, enxaguagem, abrandamento, solubilização de minerais, solubilidade e corrosividade (TINOCO et al., 2017).

2.3.2.4 Enxágüe

Após a lavagem com detergentes, os equipamentos devem ser enxaguados para promover a remoção completa de resíduos suspensos e traços dos componentes de limpeza. Para garantir uma completa remoção de detergentes alcalinos recomenda-se a aplicação de algumas gotas de fenolftaleína para avaliar a eficácia do enxágüe, devendo a água permanecer incolor indicando pH inferior a 8,3. A remoção de detergentes ácidos pode ser avaliada usando-se como indicador o metilorange que neste caso deixará a água com uma coloração amarelada indicando pH próximo da neutralidade (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.3.2.5 Sanitização

A sanitização é uma etapa complementar da higienização, serve para assegurar a qualidade microbiológica das superfícies e deve ser realizada iminentemente antes do uso dos equipamentos, pois micro-organismos indesejáveis que não foram eliminados podem se multiplicar após a etapa da limpeza a qual tem por função eliminar os micro-organismos patogênicos e reduzir a níveis aceitáveis os alteradores (ROVIRA, 2016). De maneira geral, espera-se que os sanitizantes apresentem toxicidade e corrosividade baixas, sejam estáveis nas mais diversas condições de uso, possuam amplo espectro de ação antimicrobiana, destruam rapidamente os agentes e sejam aprovados pelos órgãos competentes como o Ministério da Saúde. Porém, não existe um único produto que apresente todas essas características, por isso, é importante conhecer as propriedades de cada um que esteja disponível para selecionar o mais adequado para cada aplicação específica (ANDRADE, 2008; HOFFMANN, 1995).

A ação dos sanitizantes é afetada pelas características das superfícies, tempo e temperatura de contato, concentração, diferentes tipos de resíduos presentes nas superfícies, pH, propriedades físico-químicas da água, substâncias inativadoras. O tipo e a concentração dos micro-organismos contaminantes de superfície também influenciam,

como por exemplo, os esporos que apresentam maior resistência que as células vegetativas. Ou ainda, sanitizantes que são mais efetivos sobre bactérias gram-negativas do que para gram-positivas (ANDRADE, 2008).

Os mecanismos de ação dos produtos desinfetantes incluem: impedimento do metabolismo celular pelo bloqueio da membrana, coagulação das proteínas celulares, dissolução de substâncias celulares, lesão irreversível e alteração da pressão osmótica (SPREER, 1991).

24 Sanitizantes

2.4.1 Compostos Fenólicos

O fenol é uma substância incolor, solúvel em água, de difícil manipulação que age alterando a permeabilidade da membrana celular permitindo o extravasamento de constituintes essenciais a célula, como os aminoácidos (ANDRADE, 2008).

Existem várias preparações contendo fenol, tais como: clorofeno, ortofenilfenol, timol, triclosan e os fenólicos que são derivados do fenol (ácido carbólico). Estes são bactericidas de amplo espectro, pouco tóxicos e sua atuação não é prejudicada pela presença de matéria orgânica (MENDES et al., 2004; SPINOSA et al., 2006; GREZZI, 2009).

O fenol exerce ação bactericida (principalmente contra bactérias gram-positivas e fungicida. Sua ação viricida depende da formulação já que nem todos os produtos são iguais, alguns fenóis podem não ser eficazes contra vírus não-envelopados e esporos, a substituição do halogênio intensifica a potência biocida dos derivados dos fenóis e a introdução de grupos aromáticos no núcleo dos fenóis halogenados aumenta a sua potência bactericida (SPINOSA et al., 2006; GREZZI, 2009).

As vantagens de utilizar os fenóis é que em geral, compostos fenólicos quando depositados sobre as superfícies, reagem com a umidade e passam a exercer ação antimicrobiana residual, também são menos inativados por matéria orgânica que os detergentes, compostos quaternários de amônia ou soluções de cloro e não são corrosivos para metais (SPINOSA et al., 2006). Já as desvantagens seriam que os compostos fenólicos costumam ser irritantes ou corrosivos, dependendo da concentração usada e da duração de exposição, têm odor muito forte e se tiverem

exposição prolongada nos humanos, podem causar irritação da pele (SPINOSA et al., 2006; GREZZI, 2009).

2.4.2 Hipoclorito de sódio

O hipoclorito de sódio é um composto químico com a fórmula NaOCl ou NaClO, compreendendo um cátion de sódio (Na^+) e um ânion hipoclorito (OCl^- ou ClO^-). Também pode ser visto como o sal de sódio do ácido hipocloroso. O hipoclorito de sódio é mais frequentemente encontrado como uma solução diluída amarelo-esverdeada pálida, comumente conhecida como alvejante líquido ou simplesmente alvejante, um produto químico doméstico amplamente utilizado (desde o século XVIII) como desinfetante ou agente clareador. O composto em solução é instável e se decompõe facilmente, liberando o cloro, que é o princípio ativo de tais produtos (FUKUZAKI, 2006).

A capacidade descontaminante do hipoclorito de sódio tem sido estudada em diversos trabalhos. Lopez (1986) encontrou que uma concentração de 0,01% foi suficiente para reduzir 5 Log_{10} de uma população de *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus typhimorium*, estes últimos são patógenos comuns na indústria de laticínios. Diferentes sanitizantes foram testados para determinar a concentração ótima para reduzir a contaminação induzida em superfícies porosas e não porosas inoculadas com *Bacillus subtilis*, utilizando uma mistura de hipoclorito de sódio com peróxido de hidrogênio, no qual foi demonstrado efetivamente uma redução em ambas superfícies (DeQUEIROZ & DAY, 2007). Neste trabalho ficou demonstrado que atuação do hipoclorito de maneira individual foi menos efetiva que na mistura com o peróxido de hidrogênio. A atividade microbiana do hipoclorito de sódio depende da concentração, luz, pH, temperatura, presença de metais pesados e matéria orgânica.

2.4.3 Ácido peracético

O ácido peracético ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_3$) é uma mistura de ácido acético (CH_3COOH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em solução aquosa. É um líquido incolor brilhante que tem odor penetrante e um baixo pH (2,8). Quando o ácido peracético se dissolve na água, ele se desintegra em peróxido de hidrogênio e ácido acético, que se desintegra na

água, oxigênio e dióxido de carbono. Os produtos da degradação do ácido peracético não são tóxicos e podem dissolver-se facilmente na água. O ácido peracético é um oxidante muito poderoso; o potencial de oxidação ultrapassa o do cloro e do dióxido de cloro. O ácido peracético como desinfetante oxida as membranas celulares externas dos micro-organismos (GAD, 2014).

O mecanismo de oxidação consiste em transferência de elétrons. Quando um oxidante mais forte é usado, os elétrons são transferidos para o micro-organismo muito mais rápido, fazendo com que o micro-organismo seja desativado rapidamente (*Center for Disease Control and Prevention*, 2016). Um estudo realizado por Akinbobola e colaboradores (2017) para avaliar a eficiência do ácido peracético na eliminação de células planctônicas e biofilmes com *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrou que as células planctônicas de *P. aeruginosa* foram erradicadas em 0,002% de ácido peracético, enquanto os biofilmes mostraram uma tolerância dependente da idade para o ácido peracético, e o biofilme de 96 h foi erradicado apenas na concentração de ácido peracético de 0,25%.

2.4.4 Compostos de quaternário de amônia (QATs):

Os QATs são considerados desinfetantes de baixo nível, conforme definido pelos Centro dos EUA para o Controle e Prevenção de Doenças. Eles são eficazes contra a maioria das bactérias vegetativas e vírus e alguns fungos. As condições necessárias para atingir a desinfecção com os QATs dependem da concentração e do tempo de contato. As concentrações típicas de uso final terão de 0,05 a 0,2% de QAT, e requerem 10 min para obter a desinfecção (TEZEL; PAVLOSTATHIS, 2015).

Produtos desinfetantes utilizando compostos de amônio quaternário (QATs) como ingrediente ativo estão entre os mais amplamente utilizados. Entre as vantagens dos QATs estão: boa estabilidade e toxicologia, atividade de superfície e compatibilidade com ingredientes de formulação mais limpos, e falta de odor. Essas propriedades o tornam adequado para produtos de consumo que combinam limpeza com desinfecção. Os compostos com QAT são muito mais específicos em seu mecanismo antimicrobiano. Mesmo concentrações muito baixas causam danos à membrana citoplasmática devido à perturbação das bicamadas pelas cadeias de alquila das moléculas (WESSELS & INGMER, 2013). Tem havido a preocupação de que o seu uso

generalizado levará ao desenvolvimento de organismos resistentes, e tem sido sugerido o uso de limites para seu uso. Embora tenham sido observados aumentos na tolerância aos QACs, não há evidências claras para apoiar o desenvolvimento de resistência aos QACs. Apesar de existirem numerosos estudos de laboratório sobre a eficácia dos QACs, relativamente poucos estudos foram realizados para avaliar sua eficácia na prática. Testes padronizados mais efetivos para avaliar e definir as diferenças entre aumentos de tolerância versus resistência são necessários (GERBA, 2015).

2.4.5 Eficiência dos Sanitizantes

Em sentido estrito, a sanitização consiste em reduzir, mas não necessariamente eliminar os micro-organismos do ambiente inanimado para níveis considerados seguros, conforme determinado por códigos ou regulamentos de saúde pública (ROVIRA, 2016). A avaliação da eficiência dos sanitizantes é bastante complexa, principalmente em razão dos inúmeros fatores que podem afetá-la. Assim, a natureza e tipo de superfícies tratadas, a concentração e natureza dos resíduos, o tipo de microbiota contaminante na superfície, a concentração e o período de contato do sanitizante com a superfície são apenas algumas das variáveis que poderão influenciar, em menor ou maior grau, a eficiência dos sanitizantes (ANDRADE, 2008).

As comprovações da eficiência microbiológica dos sanitizantes químicos são necessárias, e uma das formas de se confirmar isso é por meio de testes laboratoriais, como os de diluição de uso, de capacidade, de coeficiente fenólico, teste esporicida e de suspensão. Deve-se frisar que apenas a determinação do princípio ativo dos produtos sanitizantes comerciais ou de suas soluções diluídas para uso rotineiro no procedimento de higienização não são suficientes para definir a atividade antimicrobiana, pois produtos que originam soluções sanitizantes com a mesma concentração de princípio ativo poderão apresentar eficiência diferente sobre os micro-organismos (ANDRADE, 2008).

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 14, sugere o uso de um micro-organismo indicador para avaliar a efetividade dos produtos sanitizantes e desinfetantes de uso geral e para a indústria de alimentos, dentre os que se destacam: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli* (BRASIL, 2007).

Em relação ao método adotado pelo Centro Europeu de Normalização (CEN) para a avaliação da atividade antimicrobiana de saneantes usados em ambientes

domiciliares ou institucionais, os produtos são avaliados quanto à capacidade de eliminar os micro-organismos, na presença de substâncias interferentes e em superfície (com a utilização de discos de aço inox). A fase 1 (teste em suspensão) tem como objetivo a obtenção de um resultado preliminar sobre o produto teste, etapa utilizada principalmente pelas próprias indústrias produtoras para ajuste da concentração do princípio ativo e maior conhecimento da eficácia e características do produto que está sendo desenvolvido. A fase 2 etapa 1 difere da fase 1 pela adição de substância interferente, utilizada para mimetizar a matéria orgânica encontrada nas superfícies dos ambientes, com o objetivo de se aproximar da realidade do processo de desinfecção. A fase 2, etapa 2 é um teste quantitativo em superfície não porosa para avaliação da atividade bactericida de desinfetantes químicos usados em áreas alimentícias, utiliza discos de aço inox, com o objetivo de avaliar o comportamento e eficácia do produto em uma superfície semelhante aquela onde poderá ser utilizado (EUROPEAN STANDARD 13697, 2001)

A verificação da eficácia de desinfetantes difundidos pelo ar é avaliada de acordo com a Norma Francesa NFT 72281 (AFNOR, 2014). Nesta metodologia utilizam-se discos de aço inox, para simulação de uma superfície não porosa, que são inoculados com as suspensões bacterianas em uma concentração conhecida e com uma substância interferente com o objetivo de mimetizar a matéria orgânica encontrada no ambiente, e expostos ao desinfetante testado.

Dessa forma, os desinfetantes podem ser analisados em diferentes situações e em condições simuladas que se aproximam um pouco mais da realidade, o que pode tornar a avaliação mais precisa em relação à situação real de uso dos produtos. Além disso, todas as metodologias são realizadas a partir de um inóculo inicial padronizado e o número final de células viáveis será observado, possibilitando uma análise quantitativa da ação antimicrobiana dos produtos (BLOCK, 2001).

Neste trabalho foram utilizadas as orientações preconizadas pelas normas do Centro Europeu de Normalização (CEN) para a avaliação da atividade antimicrobiana de saneantes e a Norma Francesa NFT 72281 para verificação da eficácia de desinfetantes difundidos pelo ar.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a tolerância de bactérias patogênicas à ação de um desinfetante difundido pelo ar, e a eficiência de três sanitizantes comerciais em superfícies não porosas.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a ação de um desinfetante de ortofenifenol na redução de contaminação de bactérias patogênicas baseado na norma Francesa NF-T-72281.
- Estudar a eficiência de sanitizantes comerciais em diferentes concentrações para redução de contaminação de bactérias patogênicas através do método preconizado pelo CEN.

4. MANUSCRITOS

4.1 Manuscrito I

Manuscrito elaborado para a revista *Food Science and Technology - LWT*

Estruturação conforme as normas da revista (Anexo A)

Eficácia de um desinfetante fumigante à base de ortofenilfenol (OPP) na redução de bactérias patogênicas em uma superfície de aço inoxidável

Efficacy of a smoke disinfectant based on orthophenylphenol (OPP) in the reduction of pathogenic bacteria on a stainless steel surface

Vinícius do Amaral Flores^{1*}, Neila Silvia Pereira dos Santos Richards¹

¹Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Avenida Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

* Autor correspondente

Vinícius do Amaral Flores

E-mail: viniciusamaralf@gmail.com

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar a eficácia bactericida de um desinfetante de fumigação, com princípio ativo de ortofenilfenol (OPP) contra *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*. Os testes foram realizados em discos de aço inox,

de acordo com a Norma Francesa NF-T-72281 (2014), com modificações, para avaliação de desinfetantes difundidos pelo ar. A cepa de *Staphylococcus aureus* foi a mais sensível ao desinfetante, reduzindo 6,82 Log UFC/mL. *Listeria monocytogenes* foi a cepa mais resistente ao desinfetante, com uma redução de 4,66 Log UFC/mL; todos os outros micro-organismos a obtiveram uma redução superior a 5 Log em relação a sua população inicial. De acordo com a Norma Francesa, o desinfetante difundido pelo ar testado é considerado eficaz quando a redução é superior a 5 Log UFC/mL. Os resultados indicaram que o desinfetante fumigante a base de ortofenilfenol (OPP) tem uma atividade bactericida efetiva contra *E. coli*, *Enterococcus hirae*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*.

Palavras-chave: sanitizante, bactérias, fenol, fumigante

Abstract

The objective of this study was to verify the bactericidal efficacy of a fumigation disinfectant with an active ingredient of orthophenylphenol (OPP) against *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Listeria monocytogenes*. The tests were carried out on stainless steel disks, according to French Standard NF-T-72281, with modifications, for evaluation of disinfectants diffused by air. *Staphylococcus aureus* was more sensitive to the disinfectant, reducing 6,82 Log CFU/mL. *Listeria monocytogenes* was the most resistant strain to the disinfectant, with a reduction of 4,66 Log CFU/mL; all other microorganisms tested showed a reduction greater than 5 Log in relation to their initial population. According to the French Standard, the airborne disinfectant tested is considered effective when the reduction is greater than 5 Log CFU/mL. The results indicated that the fumigant disinfectant based on orthophenylphenol (OPP) has an

effective bactericidal activity against *E. coli*, *Enterococcus hirae*, *S. aureus*, *S. typhimurium* and *P. aeruginosa*.

Key words: sanitizer, bacteria, phenol, fumigant.

1 Introdução

A Organização Mundial da Saúde (OMS), considera que as doenças transmitidas por alimentos (DTAs) constitui um crescente problema econômico, e uma grande preocupação de saúde pública global. Em todo o mundo, estima-se que as DTA causem a morte de 420 mil pessoas por ano, a maioria das quais crianças (OMS, 2015). A ocorrência de DTA relaciona-se a diversos fatores, como, ausência de boas práticas na manipulação dos alimentos, má higienização, contaminação de superfícies e equipamentos e consumo de alimentos contaminados. Dentre as principais causas de contaminação dos alimentos estão as bactérias patogênicas (Jung, Nam, Roh & Bae, 2014).

As bactérias estão amplamente distribuídas na natureza, e têm diferentes graus de tolerância ao saneamento de rotina, e algumas são extremamente capazes de se adaptar aos diversos ambientes, podendo ser transmitidas a produtos alimentícios e afetar potencialmente a qualidade e a segurança dos alimentos (Moretro & Langsrud, 2017).

De forma geral, as bactérias Gram-negativas podem ser mais resistentes aos compostos químicos (desinfetantes e antibióticos), enquanto as Gram-positivas podem ser mais resistentes a fatores físicos como pressão, congelamento, entre outros (Tondo & Bartz, 2012).

A adoção de métodos eficazes de limpeza e sanitização pode reduzir a contaminação das superfícies e do meio ambiente a níveis adequados, a fim de garantir

a segurança e a qualidade dos alimentos (Kuaye, 2017). Para a escolha da sanitização dos ambientes industriais, além da ação antimicrobiana, fatores como segurança no manuseio, estabilidade da solução, corrosões nos equipamentos e desenvolvimento de compostos indesejáveis, devem ser considerados, despertando o interesse das indústrias no desenvolvimento de novas tecnologias e novos princípios ativos para sanitização dos ambientes (Bokulich, Lewis, Boundy-Mills & Mills, 2016).

Existem sanitizantes com diversos princípios ativos, dentre eles os que contêm fenol, como o ortofenilfenol. Os compostos fenólicos quando depositados sobre as superfícies tem sua capacidade de ação menos afetada pela matéria orgânica comparado aos detergentes, e não são corrosivos para metais. Os fenóis atuam através do dano na membrana e são ativos contra bactérias, especialmente as Gram +, o que contribui para sua atividade geral (Spinosa, Gorniak & Bernardi, 2006). Os desinfetantes fenólicos geralmente são seguros para humanos (Grezzi, 2008) e podem ser usados para descontaminar o ar ambiente se usados como agentes geradores de fumaça (Bernardi et al., 2019).

Desta forma, ressalta-se a importância do emprego de procedimentos de higienização eficientes com foco na prevenção de contaminações de natureza microbiana. Estudos da utilização de sanitizantes a base de compostos fenólicos contra a ação de bactérias na indústria alimentícia ainda são incipientes. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um sanitizante fumigante a base de ortofenilfenol na forma de fumaça seca contra bactérias patogênicas.

2 Material e Métodos

2.1 Desinfetante para gerador de fumaça, concentrações recomendadas e sala de testes

O produto testado foi um desinfetante de ortofenilfenol (OPP) 15% p/p à base de fumaça. Este produto é comercializado no Brasil e certificado e aprovado pela Agência de Vigilância Sanitária - ANVISA para a higienização de ambientes da indústria alimentícia sem o contato com alimentos ou matérias-primas. O produto é apresentado em um formato cilíndrico (100 cm³) em uma embalagem de estanho. Os testes foram realizados em câmara fria a temperatura ambiente (25 °C), de aproximadamente 32 m³, higienizada antes do teste. A utilização do produto na sala de teste foi realizada primeiramente removendo a proteção de vedação e posicionando a lata sobre uma superfície com resistência ao calor, a uma distância de 2,6 m dos discos inoculados com os micro-organismos. Foi aceso o pavio, e após alguns segundos verificou-se o funcionamento do produto, com a fumaça difundindo-se por todo ambiente.

De acordo com o fabricante a dosagem de aplicação indicada de OPP é de 1 g do produto por m³ para este tipo de função. O tempo de exposição é de 7 h, mantendo a sala fechada até o final do teste. Após, o ambiente deve ser aberto para ventilação por pelo menos 15 min antes da entrada de pessoal.

22 Cepas bacterianas e manutenção dos micro-organismos de referência

Neste trabalho, foram utilizadas seis cepas de referência doadas pela Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz; *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Enterococcus hirae* (ATCC 8043), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 35152).

Ampolas contendo micro-organismos liofilizados foram reconstituídas com 1,0 mL de caldo soja tríptica (TSB)(KASVI, Itália). Essa suspensão foi diluída em 5,0 mL

do mesmo caldo e agitada para obter uma suspensão homogênea. A suspensão bacteriana, 0,5 mL da suspensão, foi inoculada em placas de Petri contendo meio ágar soja tríptica (TSA) (KASVI, Itália), gerando um crescimento confluyente na placa. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C.

À placa com crescimento confluyente, foram adicionados 10 mL de solução crioprotetora (extrato de carne, digesto pancreático de caseína e glicerol), realizando-se uma raspagem da superfície para a obtenção de uma suspensão de células. Essa suspensão bacteriana foi alíquotada e congelada. A partir da suspensão preservada, foi obtida a cultura de trabalho (European Standard 12353, 2006).

23 Suspensão bacteriana de trabalho

Utilizando uma alça descartável de 10 µl, alçadas da suspensão bacteriana preservada foram transferidas para cada tubo contendo meio TSA inclinado, incubados por 24 h a 37 °C. Após o crescimento, foi adicionada água peptonada 0,1% para atingir uma suspensão bacteriana com concentração de 10^9 UFC/mL. Para avaliação da neutralização utilizou-se uma concentração de 10^8 UFC/mL (European Standard 12353, 2006).

24 Determinação da eficácia do desinfetante de fumigação

A eficácia do experimento foi avaliada pelo método específico para desinfetantes difundidos pelo ar, de acordo com a Norma NFT 72281, com modificações (AFNOR, 2014). O fluxograma do experimento é demonstrado na Figura 1. Os suportes, feitos de discos de aço inox foram previamente tratados com 5% de

Triton X-100 (INLAB, São Paulo, Brasil) por 60 minutos, para a retirada de sujidades. Após esse período, os discos foram tratados com isopropanol 70% (v/v) por 24h (Neon, São Paulo, Brasil).

25 Controle do neutralizante

Foi realizada uma etapa de neutralização para garantir que o produto testado agisse apenas no tempo determinado do teste. Discos de aço inox não contaminados foram expostos ao fumígeno por 7 horas, para que o desinfetante pudesse se depositar nas superfícies dos discos de aço inox. Após, os discos foram imersos em 100 mL de solução neutralizante indicada na norma NF T 72-281 (1 g/L triptona, 8,5 g/L cloreto de sódio, 5 g/L polissorbato 80%) com 5 g de pérolas de vidro. Após 5 minutos, foi inoculado em placa de Petri 1 mL do fluido de recuperação contendo o resíduo transportador e 1 mL da suspensão bacteriana ajustada 10^8 UFC/mL. O plaqueamento foi efetuado pelo método *pour plate* em duplicata em meio TSA, incubados a 37 °C por 48 horas. Posteriormente, as colônias foram contadas e a eficácia da neutralização dos resultados comparada com um controle positivo.

26 Avaliação da eficácia bactericida

Para avaliar a eficiência do sanitizante foram inoculados nos discos de aço inox 50 µl da suspensão bacteriana ajustada na concentração de 10^9 UFC/mL com adição de 0,05% de leite em pó desnatado reconstituído (Elegê, Rio Grande do Sul, Brasil), utilizado como substância interferente, simulando a presença de matéria orgânica na ação do produto sanitizante. Os discos foram, então, incubados a 37 °C por 40 minutos.

Para cada experimento foram utilizados cinco discos de aço inox, três foram expostos ao sanitizante, e dois como controle positivo. O controle positivo não é exposto ao sanitizante, porém é submetido a um tempo de latência idêntico ao tempo de contato dos testes em uma placa de Petri fechada, mantido no laboratório em uma capela de fluxo laminar.

Os discos foram expostos ao desinfetante a uma distância de 2,6 m, na posição vertical, com a superfície inoculada com a suspensão bacteriana voltada para o lado oposto de onde o desinfetante foi liberado. A câmara permaneceu fechada por 7 horas (tempo de ação recomendado do produto).

Após a ação do produto, o ambiente foi aberto por 15 minutos para ventilação e posterior entrada na sala. Ambos os discos inoculados (não expostos e expostos ao agente fumigante) tiveram os micro-organismos viáveis recuperados em 100 mL de líquido de recuperação e agitados durante 1 min com 5 g de pérolas de vidro. Diluições em série (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} ; 10^{-5}) foram realizadas em água peptonada a 0,1% (m/v).

27 Plaqueamento e contagem de bactérias

O plaqueamento foi efetuado pelo método *pour plate* em duplicata em meio TSA, incubados a 37 °C por 48 horas. A eficácia de cada sanitizante foi avaliada pela diferença entre o número de unidades formadoras de colônias de bactérias recuperadas dos controles positivos e o dos discos expostos ao sanitizante. A partir do crescimento nas placas com meio TSA, foi realizada a contagem das UFC e os resultados foram expressos em valores Log_{10} UFC/mL.

A taxa de redução para bactérias foi interpretada a partir da norma NFT 72 281, em que a redução deve ser maior ou igual a 5 Log nos discos expostos ao desinfetante

em comparação ao controle positivo, não exposto ao produto e inoculado com a mesma suspensão bacteriana inicial. Todos os testes foram realizados três vezes e em dias diferentes.

3 Resultados e Discussão

A neutralização é uma etapa de grande importância em qualquer método para avaliação de eficácia (Russel, 1981). A solução neutralizante utilizada foi eficiente, garantindo que o produto testado agiu apenas no tempo determinado do teste.

Os resultados da avaliação da eficiência do fumígeno baseado em ortofenifenol sobre cepas de micro-organismos são apresentados na Figura 2.

A cepa de *Staphylococcus aureus* foi a que demonstrou a maior redução após o tratamento, de 6,82 Log UFC/mL. O desinfetante também foi eficiente nas seguintes cepas de bactérias: *Escherichia coli*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, as quais apresentaram uma redução de 6,01 Log UFC/mL (100%), 5,64 Log UFC/mL (88,97%), 5,96 Log UFC/mL (100%), 5,68 Log UFC/mL (91,57%), respectivamente; demonstrando que o desinfetante cumpre com os valores de acordo com a norma NF 72 281, que preconiza que para o desinfetante ser considerado eficiente deve ter uma redução superior a 5 Log.

Resultados similares foram encontrados no estudo de Park et al. (2013), em que foi avaliado o efeito bactericida de um fumígeno (fumegador desinfetante) com 20% de ortofenilfenol (OPP) contra *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*, obtendo uma redução após a exposição por 15 horas ao desinfetante de 5,64 e 5,26 Log UFC/mL, respectivamente. Em outro trabalho, verificou-se a redução 6,43 Log UFC/mL de *Staphylococcus aureus* inoculados em suportes de aço inox, quando expostos a um fumígeno a uma concentração de 20% de OPP (Cha et al., 2013). Da mesma forma, foi

verificada a redução de 5,19 Log UFC/mL de *Enterococcus hirae* e 6,46 Log UFC/mL *Pseudomonas aeruginosa*, inoculados em suportes de aço inox, quando expostos a um fumígeno a uma concentração de 20% de OPP (Cha, Park, et al., 2014^a).

A eficácia esporicida de um desinfetante de fumigação contendo 20% de ortofenilfenol foi avaliada contra esporos de *Clostridium perfringens*. O teste de eficácia do fumigante contra estes esporos foi realizado de acordo com a norma francesa NF T 72-281, mostrando uma redução de 4,52 Log₁₀ UFC/mL (Cha, Cho & Lee, 2014^b).

Compostos fenólicos podem inativar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, através da ruptura da membrana celular, com o vazamento dos constituintes celulares. Os fenóis em altas concentrações apresentam atividade bactericida, enquanto em baixas concentrações são bacteriostáticos (Larini, 2007). O Ortofenilfenol (OPP) tem sido usado em residências, indústrias alimentares e hospitais para desinfetar materiais de superfícies (Coelhan, Bromig, Glas, & Roberts, 2006).

Andersen et al. (2010) utilizou uma névoa seca de peróxido de hidrogênio 5% para testar a descontaminação da superfície de amostras de *Mycobacterium tuberculosis*, não obtendo efeito significativo de descontaminação.

A ação de sanitizantes em aerossol sobre biofilmes de *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*, foram avaliados por Park et al. (2012), os quais encontraram que o tratamento com 0,01% de ácido peracético foi mais eficiente que a mesma concentração de hipoclorito de sódio com o aumento do tempo de exposição para todos os patógenos testados.

Em um estudo realizado para avaliar a eficácia bactericida de um desinfetante de fumigação contendo 35% de paraformaldeído contra *Salmonella Typhimurium*, houve uma redução da população inicial de 5,25 Log₁₀ (Cha et al., 2016).

O fumígeno testado reduziu em 4,66 Log UFC/mL em relação a concentração inicial para a cepa de *Listeria monocytogenes*, não atingindo a redução de 5 Log exigida pela norma NF 72281. *L. monocytogenes* é um dos patógenos de origem alimentar mais importantes na atualidade, pela sua capacidade de contaminar ambientes de processamento de alimentos, podendo formar biofilmes em equipamentos, utensílios, pisos e drenos, alcançando produtos finais por contaminação cruzada (Camarago, Woodward, Call & Nero, 2017). Em casos específicos de contaminação por *L. monocytogenes* em indústrias, o desinfetante fumigante testado com OPP a 15% p/p, poderia ter sua concentração aumentada para obter uma maior eficiência frente a este patógeno.

4 Conclusão

Em conclusão, o tratamento com um desinfetante à base de ortofenilfenol (OPP) foi eficiente na diminuição dos níveis *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. hirae*, *S. enterica* serovar Typhimurium e *L. monocytogenes* inoculados em discos de aço inoxidável. Os resultados mostraram que o desinfetante à base de ortofenilfenol (OPP) pode ser usado como maneira eficaz na redução de até 6 Log de populações de patógenos em superfícies.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Referências

AFNOR, NF T72-281 (2014). NF T72-281. Procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne - Détermination de l'activité bactéricide, fongicide, levuricide, mycobactéricide, tuberculocide sporicide et virucide incluant les bactériophages.

- Andersen, B. M., Syversen, G., Thoresen, H., Rasch, M., Hochlin, K., & Seljordslia, B. (2010). Failure of dry mist of hydrogen peroxide 5 % to kill Mycobacterium tuberculosis. *Journal of Hospital Infection*, 76(1), 80–83. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2010.03.013>
- Bernardi, A. O., Santos, T., Stefanello, A., Garcia, M. V., Parussolo, G., Dornelles, R. C. P., & Copetti, M. V. (2019). International Journal of Food Microbiology Sensitivity of food spoilage fungi to a smoke generator sanitizer. *International Journal of Food Microbiology*, 289 (May 2018), 72–76. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.004>
- Bokulich, N. A., Lewis, Z. T., Boundy-Mills, K., Mills, D. A. (2016). Uma nova perspectiva sobre paisagens microbianas na produção de alimentos. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 37, 182 – 189.
- Camarago, A. C., Woodward, J. J., Call, D. R., Nero, L. A. (2017). *Listeria monocytogenes* in Food-Processing Facilities, Food Contamination, and Human Listeriosis: The Brazilian Scenario. *Foodborne Pathogens and Disease*, 14(11), 623 - 636.
- Cha, C.-N., Cho, Y., & Lee, H.-J. (2014^b). Sporicidal Efficacy of a Fumigation Disinfectant Compositod to Ortho-phenylphenol Against Spores of *Clostridium Perfringens*. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 29(3), 217–222. <https://doi.org/10.13103/jfhs.2014.29.3.217>
- Cha, C.-N., Park, E.-K., Choi, H., Kim, Y., Yoo, C.-Y., Kim, S., & Lee, H.-J. (2013). Bactericidal Efficacy of Fumagari OPP ® , Fumigant Against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 28(4), 349–353. <https://doi.org/10.13103/jfhs.2013.28.4.349>
- Cha, C.-N., Park, E.-K., Kim, Y., Yu, E.-A., Yoo, C.-Y., Hong, I.-H., ... Lee, H.-J.

- (2014^a). Bactericidal Efficacy of a Fumigation Disinfectant with Ortho-phenylphenol as an Active Ingredient Against *Pseudomonas Aeruginosa* and *Enterococcus Hirae*. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 29(1), 60–66.
<https://doi.org/10.13103/jfhs.2014.29.1.060>
- Coelhan, M., Bromig, K. H., Glas, K., & Roberts, A. L. (2006). Determination and levels of the biocide ortho-phenylphenol in canned beers from different countries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(16), 5731–5735.
<https://doi.org/10.1021/jf060743p>
- Corrégé, I., Leborne, N., Teissier, A., Richard, R., & Hémonic, A. (2015). Intérêt d'une deuxième désinfection par Ultradiffusion pour optimiser la désinfection des salles d'élevages de porcs. *Journées Recherche Porcine*, 47(1), 299–300.
- EUROPEAN STANDARD, n. 12353. Chemical disinfectants and antiseptic - Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal, sporicidal and fungicidal activity. 2006.
- Grezzi, G., 2008. Limpeza e Desinfecção na Avicultura. Ergomix Online acessível <http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/limpeza-desinfeccao-avicultura-t100/165-p0.htm/>.
- Kuaye, A.Y., 2017. Limpeza e Sanitização na Indústria de Alimentos, 4^a ed. (Brasil: Rio de Janeiro).
- Jung, M. J., Nam, Y. D., Roh, S. W., Bae, J. W. (2012). Convergência inesperada de comunidades fúngicas e bacterianas durante a fermentação de bebidas alcoólicas coreanas tradicionais inoculadas com várias entradas naturais. *Alimentos Microbiol*, 30, 112 – 123.
- Larini, L., 2007. Fármacos e medicamentos, 1^a ed. (Brasil: Porto Alegre).
- Nihal, P., Guven, C., Canan, K., Zafer, M., & Mehtap, Y. (2011). Activity of a dry mist-

- generated hydrogen peroxide disinfection system against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*. *American Journal of Infection Control*, 39, 757–762. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2010.12.003>
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 2015. Estimativas da carga global de doenças transmitidas por alimentos. Disponível em: <https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/amro_es.pdf?ua=1>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2019.
- Park, E.-K., Kim, Y., Yu, E.-A., Yoo, C.-Y., Choi, H., Kim, S., & Lee, H.-J. (2013). Bactericidal Efficacy of Fumagari OPP ® , Fumigant Against *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 28(3), 234–240. <https://doi.org/10.13103/jfhs.2013.28.3.234>
- Park, S., Cheon, H., Park, K., Chung, M., Ho, S., Ryu, S., & Kang, D. (2012). International Journal of Food Microbiology Inactivation of bio film cells of foodborne pathogen by aerosolized sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 130–134. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.018>
- Russel, A. D. Neutralization procedures in the evaluation of bactericidal activity. In: Collins, C. H., Allwood, M. C., Bloomfield, S. F., Fox, A. (1981) A. Disinfectants: their use and evaluation of effectiveness. *London Academic Press*, 229, 45-49.
- Spinosa, H., Gorniak, S., Bernardi, M., 2006. *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*, 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.35, 441-447.
- Moreto, T., Langsrud, S. (2017). Bactérias residenciais em superfícies na indústria de alimentos e suas implicações na segurança e qualidade dos alimentos. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* , 16, 1022 – 1041.
- Tondo, E. C., Bartz, S., 2012. *Microbiologia e Sistemas de Gestão da Segurança de Alimentos*. Porto Alegre: Sulina.

Figura 1. Esquema para teste da eficácia bactericida do fumígeno de acordo com o padrão estabelecido pela Norma Francesa NFT 72281 (AFNOR, 2014).

Figura 2. Redução bacteriana após exposição ao fumígeno com Ortofenilfenol (OPP).

Figura 1.

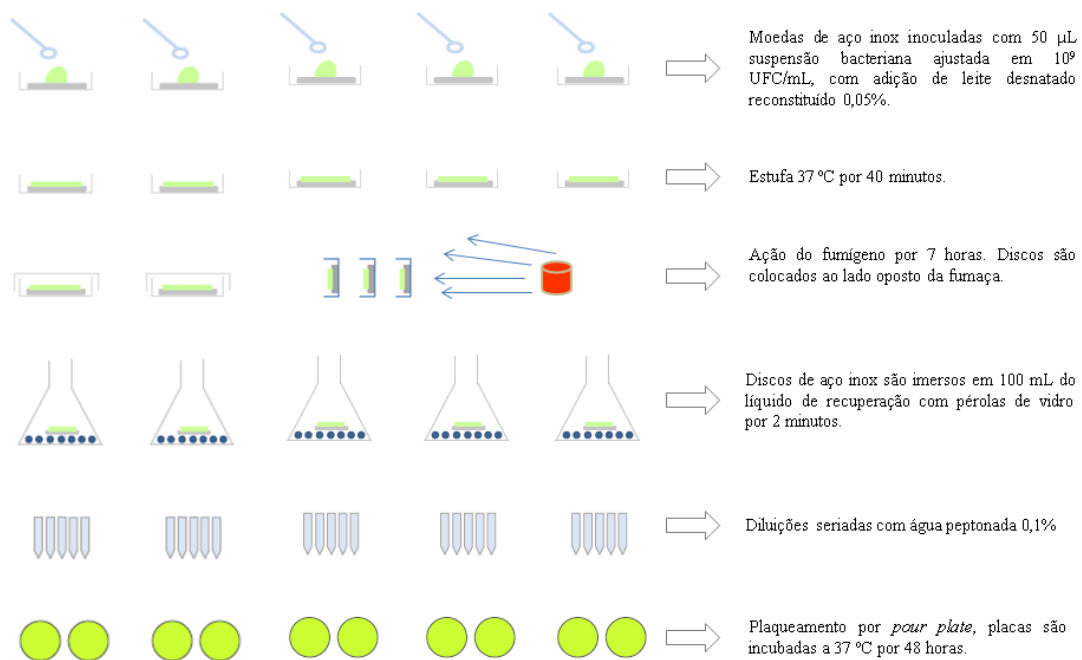
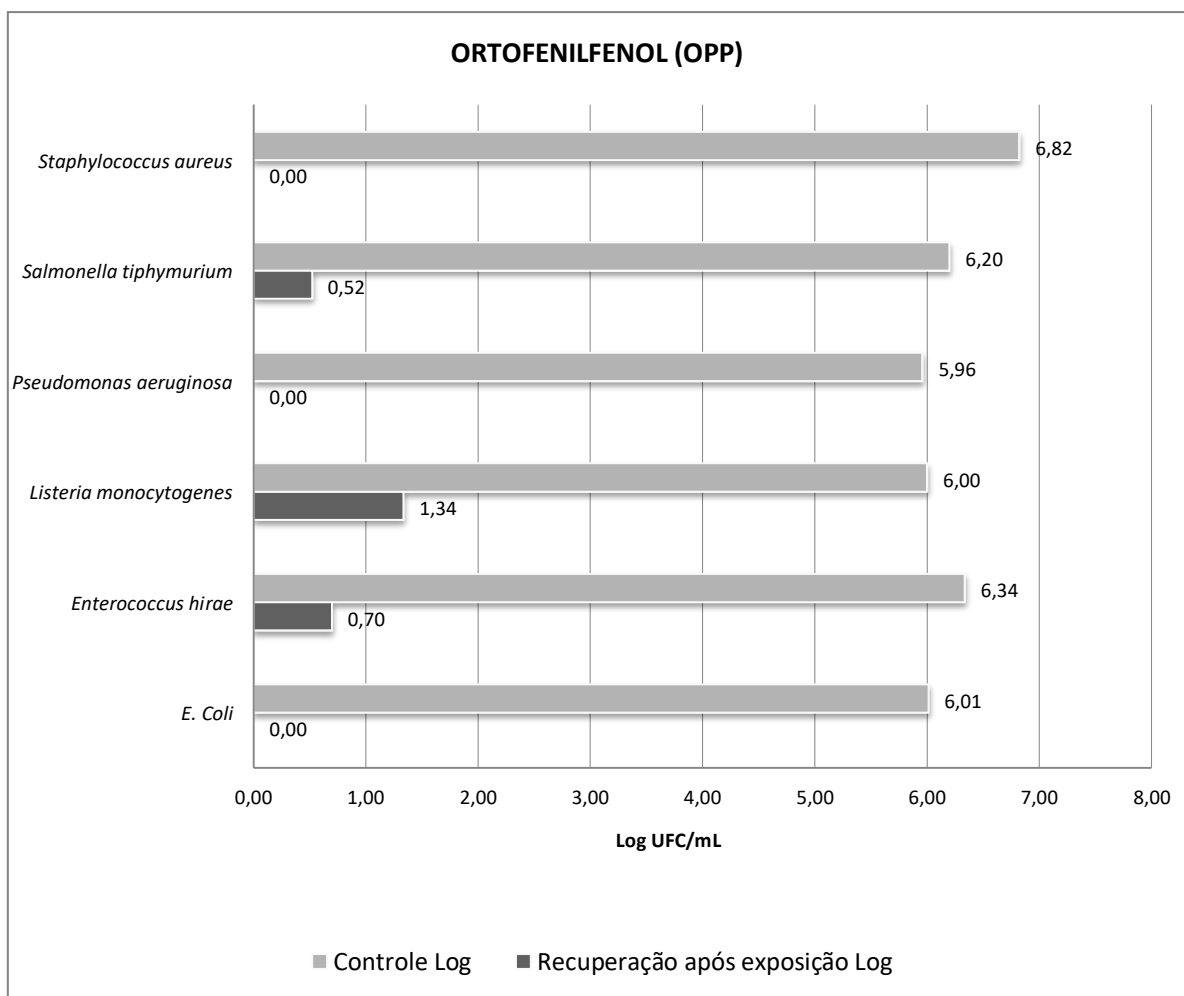


Figura 2.



42 Manuscrito II

Manuscrito elaborado para a revista *International Journal of Food Microbiology*

Estruturação conforme as normas da revista (Anexo B)

Avaliação de sanitizantes de uso comercial na redução de bactérias patogênicas

Evaluation of commercial sanitizers in the reduction of pathogenic bacteria

Vinícius do Amaral Flores^{1*}, Neila Silvia Pereira dos Santos Richards¹

¹Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Ciência e Tecnologia dos Alimentos. Avenida Roraima 1000, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.

* Autor correspondente

Vinícius do Amaral Flores

E-mail: viniciusamaralf@gmail.com

Resumo

Foram avaliados três sanitizantes comerciais em diferentes concentrações; ácido peracético (0,05%, 0,5%, 1%), hipoclorito de sódio (0,2%, 0,6%, 1%) e quaternário de amônia (0,3%, 1,15%, 2%), para verificar a ação bactericida destes sanitizantes contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella tiphymurium*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Os testes foram realizados em discos de aço inox, simulando uma superfície não porosa, de acordo com a metodologia

do Comitê Europeu de Normalização (CEN), com modificações. Ácido peracético na concentração de 1% foi o sanitizante que apresentou melhor capacidade de inativação, com uma redução superior a 7 Log₁₀ UFC/mL para todas cepas testadas. Cepa de *Pseudomonas aeruginosa* demonstrou uma alta resistência ao hipoclorito de sódio e quaternário de amônia, com uma redução de 19,11% e 20,08%, respectivamente, na concentração máxima testada. Hipoclorito de sódio e quaternário de amônia nas suas concentrações máximas inativaram *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. hirae*, *L. monocytogenes* e *E. coli*, com uma redução superior a 7 Log₁₀ UFC/mL. De acordo com CEN o sanitizante deve reduzir no mínimo em 5 Log₁₀ a população bacteriana para ser considerado eficiente. De acordo com os resultados, verificou-se que os sanitizantes com ácido peracético, hipoclorito de sódio e quaternário de amônia demonstraram uma capacidade de inativação desejável, para a maioria dos micro-organismos avaliados.

Palavras-chave: desinfetante, bactérias, redução

Abstract

Three commercial sanitizers at different concentrations were evaluated; peracetic acid (0,05%, 0,5%, 1%), sodium hypochlorite (0,2%, 0,6%, 1%) and quaternary ammonium (0,3%, 1,15%, 2%) to verify the bactericidal action of these disinfectants against *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus hirae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. The tests were performed on stainless steel discs, simulating a non-porous surface, according to the methodology of the European Committee for Standardization (CEN), with modifications. Peracetic acid at a concentration of 1% was the sanitizer that presented the best inactivation capacity, with a reduction of more than 7 Log₁₀ CFU/mL for all strains tested. *Pseudomonas*

aeruginosa strain showed a high resistance to sodium hypochlorite and quaternary ammonium, with a reduction of 19,11% and 20,08%, respectively, at the maximum concentration tested. Sodium hypochlorite and quaternary ammonium in their maximum concentrations inactivated *S. aureus*, *S. typhimurium*, *E. hirae*, *L. monocytogenes* and *E. coli*, with a reduction greater than 7 Log₁₀ CFU/mL. According to CEN the sanitizer should decrease bacterial population by at least 5 Log₁₀, to be considered efficient. According to our results we can verify that the sanitizers with peracetic acid, sodium hypochlorite and quaternary ammonium showed a desirable inactivation capacity in most of the microorganisms evaluated.

Key words: disinfectant, bacteria, reduction.

1 Introdução

A redução do risco de contaminação em ambientes e superfícies onde matérias primas são manipuladas e processadas para a produção de alimentos, é uma tarefa permanente e obrigatória para a indústria processadora de alimentos, e depende, em grande parte, da eficiência dos programas de sanitização, dos métodos e produtos utilizados. A ocorrência de contaminação poderia derivar em problemas como a transmissão de doenças transmitidas por alimentos (DTAs), uma vez que estes são incorporados nas cadeias de comercialização até a chegada ao consumidor (Chauret, 2014).

Dentro de uma área de processamento de alimentos, as bactérias patogênicas podem ser disseminadas através de diferentes elementos que podem entrar em contato com os alimentos como tábuas de corte, facas, máquinas de processamento, os quais podem atuar como reservatório e/ou veículos dos patógenos (Falcó et al., 2019). Alguns

dos micro-organismos causadores de doenças como a *Salmonella* spp., e *Listeria monocytogenes* são caracterizados por possuírem habilidade de formar biofilmes, e ser conseqüentemente mais resistentes aos programas de higienização, ambos apresentam alta incidência na indústria de processamento de aves (Ziech et al., 2016; Olszewska et al., 2016).

A sanitização é a combinação de atividades e procedimentos com o intuito de manter livres de perigos de contaminação objetos, equipamentos e superfícies inanimadas onde se dá o preparo, consumo e estocagem de matérias primas, diminuindo as ameaças à segurança alimentar que poderiam reduzir o *shelf life* dos alimentos processados (Rovira, 2016). Desta forma, um sanitizante é um agente/produto que reduz o número de bactérias a níveis seguros de acordo com as normas de saúde (BRASIL, 2007).

Na hora da escolha dos produtos sanitizantes para superfícies de contato com alimentos, é importante considerar a efetividade na redução da contaminação microbiana em condições específicas, custos, facilidade de aplicação, necessidade de enxaguar, propriedades irritantes e toxigênicas, e compatibilidade com a disponibilidade de água no local (Fong, 2011). Normalmente, em cada país existe regulamentos que determinam o âmbito de aplicação, substâncias ativas permitidas e considerações específicas para rotulagem dos produtos utilizados como sanitizantes, desinfetantes ou produto de uso geral. É possível também encontrar uma lista de micro-organismos para avaliação de atividade antimicrobiana e sua classificação dependendo do local onde estes produtos serão aplicados (BRASIL, 2007).

A pesquisa entorno da avaliação de diversos compostos como potenciais sanitizantes, pretende mostrar a efetividade na redução máxima da população de micro-organismos patogênicos que tem alta probabilidade de estar presente em ambientes e

superfícies de contato com alimentos. Nesse sentido, tem sido avaliado alguns produtos, desde ácidos orgânicos, quaternário de amônia, ácido peracético, compostos clorados (Beltrame et al., 2012), até óleos essenciais (Falcó et al., 2019). Uma pesquisa permitiu avaliar a inativação e indução de lesão subletal de *Listeria monocytogenes* em biofilme a partir da utilização de sanitizantes à base de fenólicos, cloro, quaternário de amônia, ácido levulínico e SDS (Olszewska et al., 2016). Barbosa et al. (2016) comprovaram a remoção de *Escherichia coli* em facas de desossa com uso de diferentes sanitizantes, incluindo: biguanida, ácido peracético e água quente (82 °C).

Sabe-se também que certos micro-organismos causadores de infecções são resistentes a processos comuns de limpeza, sobrevivem por longos períodos em superfícies secas e podem ser transferidos não apenas pelas mãos, mas também pelo movimento do ar no ambiente. Tais considerações foram realizadas para defender a desinfecção e não apenas a limpeza de superfícies ambientais (Pereira et al., 2015). Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a efetividade de alguns sanitizantes de uso comum em diferentes concentrações na redução da população de bactérias patogênicas, simulando a aplicação em superfícies de aço inoxidável.

2 Materiais e Métodos

2.1 Eficiência de diferentes sanitizantes utilizados na indústria de alimentos

Três tipos de sanitizantes (Tabela 1) comumente utilizados em indústrias de alimentos e autorizados pela resolução RDC no. 14/2007 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) foram avaliados. Os valores mínimo e máximo testados foram os recomendados pelos fabricantes nos rótulos dos sanitizantes. Adicionalmente, uma concentração intermediária foi calculada a partir da média desses valores (Tabela

1). Para garantir que o efeito de cada sanitizante não agisse por um tempo maior que o recomendado foi efetuado uma etapa de neutralização. Neste trabalho foram utilizados neutralizadores específicos para cada princípio de higienização avaliado (Jaenisch, Kuchiishi & Coldebella, 2010) (Tabela 1).

2.2 Cepas bacterianas e manutenção dos micro-organismos de referência

Neste trabalho, foram utilizadas seis cepas de referência; *S. aureus* (ATCC 6538), *P. aeruginosa* (ATCC 9027), *E. coli* (ATCC 8739), *Enterococcus hirae* (ATCC 8043), *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028) e *Listeria monocytogenes* (ATCC 35152), doadas pela Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz.

Ampolas contendo micro-organismos liofilizados foram reconstituídas com 1,0 mL de caldo soja tríptica (TSB). Essa suspensão foi diluída em 5,0 mL do mesmo caldo e agitada até obter uma suspensão homogênea. A suspensão bacteriana, 0,5 mL da suspensão, foi inoculada em placas de Petri contendo meio ágar soja tríptica (TSA), gerando um crescimento confluyente na placa. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C.

À placa com crescimento confluyente, foram adicionados 10 mL de solução crioprotetora (extrato de carne, digesto pancreático de caseína e glicerol), realizando-se uma raspagem da superfície para a obtenção de uma suspensão de células. Essa suspensão bacteriana foi alíquotada e congelada. A partir da suspensão preservada, foi obtida a cultura de trabalho (European Standard 12353, 2006).

2.3 Suspensão bacteriana de trabalho

Utilizando uma alça descartável de 10 µl, 8 alçadas da suspensão bacteriana preservada foram transferidas para cada tubo contendo meio TSA inclinado, incubados por 24 h a 37 °C. Após o crescimento, foi adicionado água peptonada 0,1% para atingir uma suspensão bacteriana com concentração de 10⁹ UFC/mL (European Standard 12353, 2006).

2.4 Avaliação da atividade bactericida de sanitizantes comerciais

Os testes foram realizados segundo a metodologia utilizada por Bernardi et al. (2018), que empregaram padrões determinados pelo Comitê Europeu de Padronização (CEN) (European Standard 13697, 2001) para testes em superfície não porosa para avaliação da atividade bactericida e/ou fungicida de desinfetantes químicos usados em áreas alimentícia, industrial, doméstica e institucional. O fluxograma do teste é ilustrado na Figura 1.

De acordo com o padrão CEN, a diferença entre a contagem de Log UFC do controle positivo (não exposto) e a população exposta ao produto foi usada para definir a atividade antimicrobiana. O valor obtido representa quantas unidades de Log o desinfetante reduziu a população microbiológica durante o tempo de ação. Para ser considerado eficaz, os sanitizantes usados nos testes devem reduzir as populações dos micro-organismos em 5 unidades log (European Standard 13697, 2001). Neste estudo, a eficácia dos sanitizantes foi avaliada pela contagem de colônias em meio de cultura TSA, após 24h de incubação a 37 °C. Como carreadores, foram utilizados discos de aço inox 304 com 2 cm de diâmetro, previamente tratados e higienizados.

A avaliação da eficiência dos sanitizantes foi realizada pela contaminação de cinco discos com 50 µL da suspensão bacteriana ajustada a 10⁹ UFC/mL seguida de

adição de 0,05% de leite em pó desnatado reconstituído (Elegê, Rio Grande do Sul, Brasil), utilizado como substância interferente, simulando a presença de matéria orgânica na ação do produto sanitizante. Para cada cepa de bactéria avaliada, foram utilizados três discos para testar a eficácia do sanitizante (atividade bactericida), e os outros dois discos foram usados como controle positivo (não exposto). Após o processo de inoculação, ambos os grupos de discos (atividade bactericida e controle positivo) foram, então, incubados em uma estufa bacteriológica a 37 °C por 40 minutos e, posteriormente, à temperatura ambiente por mais 20 minutos para equilibrar a temperatura.

Aos discos contaminados e secos, foram adicionados 100 µL do produto teste em três concentrações diferentes [ácido peracético (0,05%, 0,5%, 1%); hipoclorito de sódio (0,2%, 0,6%, 1%); quaternário de amônia (0,3%, 1,15%, 2%)]. Para avaliação do controle positivo, o sanitizante foi substituído por 100 µL de água estéril. Após 15 minutos de contato do produto com a superfície contaminada dos discos, estes foram imersos em 10 mL de solução neutralizante específica para cada sanitizante e 5 g de pérolas de vidro. Após 5 minutos de neutralização, uma alíquota de 1 mL foi retirada, realizando diluições seriadas (Bernardi et al., 2018; European Standard 13697, 2001)

2.5 Plaqueamento e contagem de bactérias

O plaqueamento foi efetuado pelo método *pour plate* em triplicata em meio TSA, incubados a 37 °C por 24 horas. A eficácia de cada sanitizante foi avaliada pela diferença entre o número de unidades formadoras de colônias de bactérias recuperadas dos controles positivos e o dos discos expostos aos sanitizantes. A partir do crescimento nas placas com meio TSA, foi realizada a contagem das UFC e os resultados foram expressos em valores Log_{10} UFC/mL.

3 Resultados e Discussão

A Figura 2 apresenta os resultados para a eficiência do ácido peracético em diferentes micro-organismos nas concentrações de 0,05 – 1% por 15 minutos, estabelecidos pelo fornecedor. Esta figura mostra que este produto químico foi eficiente na concentração de 1%, para todos os micro-organismos testados, apresentando forte capacidade oxidante e desinfetante (Rossi et al., 2007). Na concentração de 0,5 %, este princípio ativo não apresentou eficiência apenas para *Pseudomonas aeruginosa*. Já na concentração mínima, 0,05%, este sanitizante não foi eficiente para nenhum micro-organismos avaliado. Observou-se também que os micro-organismos *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus hirae* apresentaram as maiores reduções na concentração de 0,05%, de 1,56 e 1,58 Log₁₀, respectivamente.

Um estudo conduzido por Lee et al. (2005) mostrou que o ácido peracético 2% reduziu a população bacteriana de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus hirae* em 7 Log₁₀, em teste de suspensão por 5 minutos. Martín-espada, D'ors, Bartolomé, Pereira, & Sánchez-Fortún, (2014) verificaram que em 15 minutos de ação do produto contendo ácido acético a 0,4%, foi capaz de eliminar biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* em superfícies de poliestireno em 0,85 Log₁₀. Quando avaliado a ação do ácido peracético sobre biofilmes de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* em superfícies de aço inox Iñiguez-moreno, Avila-nova & Gutiérrez-Lomelí (2018) verificaram que a solução de menor concentração (0,001%) foi capaz de inativar 3,3 Log₁₀ de *Staphylococcus aureus*, e reduzir *Salmonella* spp em 5,88 Log₁₀.

Outro estudo realizado por Barbosa, Cuppini, Flach, & Steffens (2016) avaliaram o efeito bactericida do ácido peracético a 0,2% por 10 minutos de exposição,

sobre cepas de *E. coli* em facas de aço inox, e obtiveram uma inativação de 3,57 Log₁₀. Em aço inox, os biofilmes formados em três isolados de *L. monocytogenes* foram afetados por ácido peracético (0,5%) após 3 minutos, com quase 100% de dano celular (In Lee et al., 2017).

A Figura 3 mostra a redução dos micro-organismos com a utilização de hipoclorito de sódio por 15 minutos nas concentrações de 0,2 - 1%. Após a exposição ao hipoclorito de sódio a 1%, os micro-organismos reduziram em 7 Log₁₀, com exceção da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* que inibiu 1,44 Log₁₀, taxa de redução de 19,11%. A Figura 2 também mostra que a concentração de 0,6%, o princípio ativo foi eficiente nas cepas *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus. hirae*, *E. coli* e *Salmonella Typhimurium*, reduzindo a população bacteriana em 7 Log₁₀.

Riazi & Matthews (2011) analisaram a redução dos micro-organismos em discos de aço inox e verificaram que a maior concentração (0,051%) de hipoclorito de sódio testado foi eficaz com as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteridis* e *Listeria monocytogenes*, exceto *P. aeruginosa*, que reduziu 2 Log₁₀. Rosado, Castro, Fernandes, Yorika, & Yoshiteru (2017) demonstraram a eficiência de hipoclorito de sódio 100 mg/L por 10 minutos de exposição, contra biofilmes de *E. faecalis* e *E. faecium*, reduzindo 1,40 e 2,74 Log₁₀, respectivamente.

Apesar da ineficiência do hipoclorito de sódio em todas as concentrações testadas frente a cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, outros estudos demonstraram reduções significativas. Kohler et al. (2018) verificaram a redução de 5 Log₁₀ de *Pseudomonas aeruginosa* utilizando hipoclorito de sódio a 0,04% por 15 minutos em testes de superfície com carreadores de aço inox na presença de matéria orgânica (albumina soro bovino). Discos de aço inox inoculados com *Pseudomonas aeruginosa*

foram desinfetados com hipoclorito de sódio (1,31%) por 4 minutos, e reduziram em média 8,75 Log₁₀ (Lineback et al., 2018).

Os resultados obtidos para a avaliação do quaternário de amônia são apresentados na Figura 4. O quaternário de amônio não foi eficiente contra a bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, obtendo a maior redução de 1,52 Log₁₀ na concentração de 2%. Não entanto, todos os outros micro-organismos foram inativados na mesma concentração de quaternário de amônia, com uma redução de 7 Log₁₀. Já na concentração de 1,15% a cepa de *Salmonella typhimurium* reduziu em 3,72 Log₁₀, demonstrando uma resistência ao sanitizante testado.

Poimenidou et al. (2016) analisaram a resistência de biofilmes de *Listeria monocytogenes* na superfície de aço inox por compostos de quaternário de amônia com uma média de redução de 3,9 Log₁₀. Du, Danyluk, & Harris, (2010) demonstraram que um desinfetante de álcool isopropílico/quaternário de amônia (0,02%) poderia alcançar uma redução de 4 Log de *Salmonella* (após 10-15 min) na presença de uma carga orgânica substancial. A eficácia dos desinfetantes também pode ser afetada dependendo da matéria orgânica presente. Em um estudo de Iñiguez-Moreno et al. (2018) os sanitizantes a base de quaternário de amônia (400 mg/mL) foram mais eficazes na presença de 10% de extrato de carne, enquanto sanitizantes a base de ácido peracético (200 mg/mL) apresentaram melhor atividade na presença de 10% de gema de ovo e leite integral. Neste mesmo estudo, a diminuição de *Pseudomonas aeruginosa* em superfícies de aço inox após 30 minutos foi de 1,21 Log₁₀, enquanto para *L. monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella Enteritidis* e *Salmonella typhimurium* houve uma redução de 6 Log₁₀.

Apesar dos compostos de quaternário de amônia possuírem um amplo espectro de ação, não são tão eficientes contra bactérias gram-negativas (Nascimento et al.,

2010), o que explicaria a baixa ação do sanitizante em contato com as cepas *Salmonella Typhimurium* e *Pseudomonas aeruginosa* testadas neste experimento.

4 Conclusão

Em conclusão, o tratamento com o desinfetante à base de ácido peracético foi eficaz na inativação de todas cepas patogênicas testadas. Hipoclorito de sódio e quaternário de amônia também foram eficazes na eliminação das bactérias testadas, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa* que apresentou uma alta resistência a esses dois sanitizantes.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

- Barbosa, J., Cuppini, M., Flach, J., Steffens, C., 2016. LWT - Food Science and Technology Removal of *Escherichia coli* in boning knives with different sanitizers. LWT - Food Sci. Technol. 71, 309–315. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.002>
- Beltrame, C.A., Kubiak, G.B., Lerin, L.A., Rottava, I., Mossi, A.J., Oliveira, D. De, Cansian, R.L., Treichel, H., Toniazzo, G., 2012. Influence of different sanitizers on food contaminant bacteria : effect of exposure temperature , contact time , and product concentration. *Ciência e Tecnol. Aliment.* 32, 228–233.
- Bernardi, A.O., Stefanello, A., Garcia, M.V., Parussolo, G., Stefanello, R.F., Moro, C.B., Copetti, M.V., 2018. LWT - Food Science and Technology E ffi cacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry. LWT - Food Sci. Technol. 97, 25–30. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.037>

- BRASIL, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 14, de 28 de Fevereiro de 2007. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC nº 50/06. Publicada em Diário Oficial da União nº 43, de 5 de março de 2007.
- Chauret., C.P. Sanitization. In. Carl., A.B., Tortorello., M.L. Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition), 2014, pp. 360-364.
- Du, W.X., Danyluk, M.D., Harris, L.J., 2010. Efficacy of aqueous and alcohol-based quaternary ammonium sanitizers for reducing salmonella in dusts generated in almond hulling and shelling facilities. *J. Food Sci.* 75, 7–13. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01393.x>
- EUROPEAN STANDARD, n. 13697. Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2). 2001.
- EUROPEAN STANDARD, n. 12353. Chemical disinfectants and antiseptic - Preservation of test organisms used for the determination of bactericidal, sporicidal and fungicidal activity. 2006.
- Falcó, I., Verdeguer, M., Aznar, R., Sánchez, G., Randazzo, W., 2019. Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 51, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.02.013>
- Fong., D. et al. Disinfectants and sanitizers for use on food contact surfaces. *Evidente Review.* 2011.
- In Lee, S.H., Barancelli, G.V., de Camargo, T.M., Corassin, C.H., Rosim, R.E., da Cruz, A.G., Cappato, L.P., de Oliveira, C.A.F., 2017. Biofilm-producing ability of

- Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. *Food Res. Int.* 91, 88–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.039>
- Iñiguez-Moreno, M., Avila-novoa, M.G., Gutiérrez-Lomelí, M., 2018. Journal of Global Antimicrobial Resistance Resistance of pathogenic and spoilage microorganisms to disinfectants in the presence of organic matter and their residual effect on stainless steel and polypropylene. *Integr. Med. Res.* 14, 197–201. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2018.04.010>
- Jaenisch., F.R.F., Kuchiishi., S.S., Coldebella., A., 2010. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. *Cienc. Rural* 40 (2), 384–388.
- Kohler., A.T., Rodloff., A.C., Labahn., M., Reinhardt., M., Truyen., U., Speck., S., 2018. Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. *J. Hosp. Infect.* 100, 40–46.
- Lee., M.J., Kim., Y.-S., Cho., Y.H., Park., H.-K., Park., B.-K., Lee., K.-H., Kang., K.-J., Jeon., D.-H., Park., K.-H., Ha., S.-D., 2005. Evaluation of Efficacy of Sanitizers and Disinfectants Marketed in Korea. *Korean Journal of Food Science and Technology.* 37, 671-677.
- Lineback, C.B., Nkemngong, C.A., Wu, S.T., Li, X., Teska, P.J., Oliver, H.F., 2018. Hydrogen peroxide and sodium hypochlorite disinfectants are more effective against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms than quaternary ammonium compounds. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0447-5>
- Martín-espada, M.C., D'ors, A., Bartolomé, M.C., Pereira, M., Sánchez-fortún, S., 2014. LWT - Food Science and Technology Peracetic acid disinfectant efficacy against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on polystyrene surfaces and comparison between methods to measure it. *LWT - Food Sci. Technol.* 56, 58–61.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.11.013>

Nascimento, H.M., Delgado, D.A., Filomena, I., 2010. Avaliação da aplicação de agentes sanitizantes como controladores do crescimento microbiano na indústria alimentícia. *Rev. Ceciliana* 2, 11–13.

Olszewska, M.A., Zhao, T., Doyle, M.P., 2016. Inactivation and induction of sublethal injury of *Listeria monocytogenes* in biofilm treated with various sanitizers. *Food Control* 70, 371–379. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.015>

Pereira, S.S.P., de Oliveira, H.M., Turrini, R.N.T., Lacerda, R.A., 2015. Disinfection with sodium hypochlorite in hospital environmental surfaces in the reduction of contamination and infection prevention: A systematic review. *Rev. da Esc. Enferm.* 49, 675–681. <https://doi.org/10.1590/S0080-623420150000400020>

Poimenidou, V., Chrysadaku, M., Tzakoniati, A., Bikouli, V.C., Nychas, G., Skandamis, P.N., 2016. International Journal of Food Microbiology Variability of *Listeria monocytogenes* strains in biofilm formation on stainless steel and polystyrene materials and resistance to peracetic acid and quaternary ammonium compounds. *Int. J. Food Microbiol.* 237, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.029>

Riazi, S., Matthews, K.R., 2011. International Biodeterioration & Biodegradation Failure of foodborne pathogens to develop resistance to sanitizers following repeated exposure to common sanitizers. *Int. Biodeterior. Biodegradation* 65, 374–378. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.12.001>

Rosado, M., Castro, D., Fernandes, S., Yorika, D., Yoshiteru, A., 2017. Biofilm formation on stainless steel as a function of time and temperature and control through sanitizers. *Int. Dairy J.* 68, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2016.12.005>

- Rossi, S., Antonelli, M., Mezzanotte, V., Nurizzo, C., 2007. Peracetic Acid Disinfection: A Feasible Alternative to Wastewater Chlorination. *Water Environ. Res.* 79, 341–350. <https://doi.org/10.2175/106143006x101953>
- Rovira., J. Sanitization. In. Caballero., B., Finglas., P.M., Toldrá., F. *Encyclopedia of Food and Health*, Academic Press. Kokomo., 2016. pp. 706-713.
- Ziech, R.E., Perin, A.P., Lampugnani, C., Sereno, M.J., Viana, C., Soares, V.M., Pereira, J.G., Pinto, J.P. de A.N., Bersot, L. dos S., 2016. Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. Isolated from Brazilian poultry processing plants. *LWT - Food Sci. Technol.* 68, 85–90. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.021>

Figura 1. Esquema para teste da eficácia bactericida dos sanitizantes de acordo com o padrão estabelecido pelo Comitê Europeu de Padronização (CEN) (European Standard 13697, 2001).

Figura 2. Eficácia do sanitizante ácido peracético contra bactérias patogênicas.

Figura 3. Eficácia do sanitizante hipoclorito de sódio contra bactérias patogênicas.

Figura 4. Eficácia do sanitizante quaternário de amônia contra bactérias patogênicas.

Tabela 1 – Sanitizantes permitidos para utilização na indústria de alimentos, concentrações recomendadas e respectivos neutralizantes.

| Sanitizantes | Princípio Ativo | Concentração recomendada | Neutralizante |
|-----------------------|---|---------------------------------|---|
| Ácido Peracético | Ácido peracético; peróxido de hidrogênio; ácido acético glacial | 0.05 – 1% | Caldo nutriente com 0.6% de tiosulfato de sódio |
| Hipoclorito de Sódio | Hipoclorito de sódio 8% cloro ativo | 0.2 – 1% | Caldo nutriente com 0.5% de tween |
| Quaternário de amônia | Cloreto de alquil dimetil benzil amônio | 0.3 – 2% | Caldo nutriente com 0.6% de tiosulfato de sódio |

Fonte: Jaenisch, Kuchiishi, & Coldebella, 2010.

Figura 1.

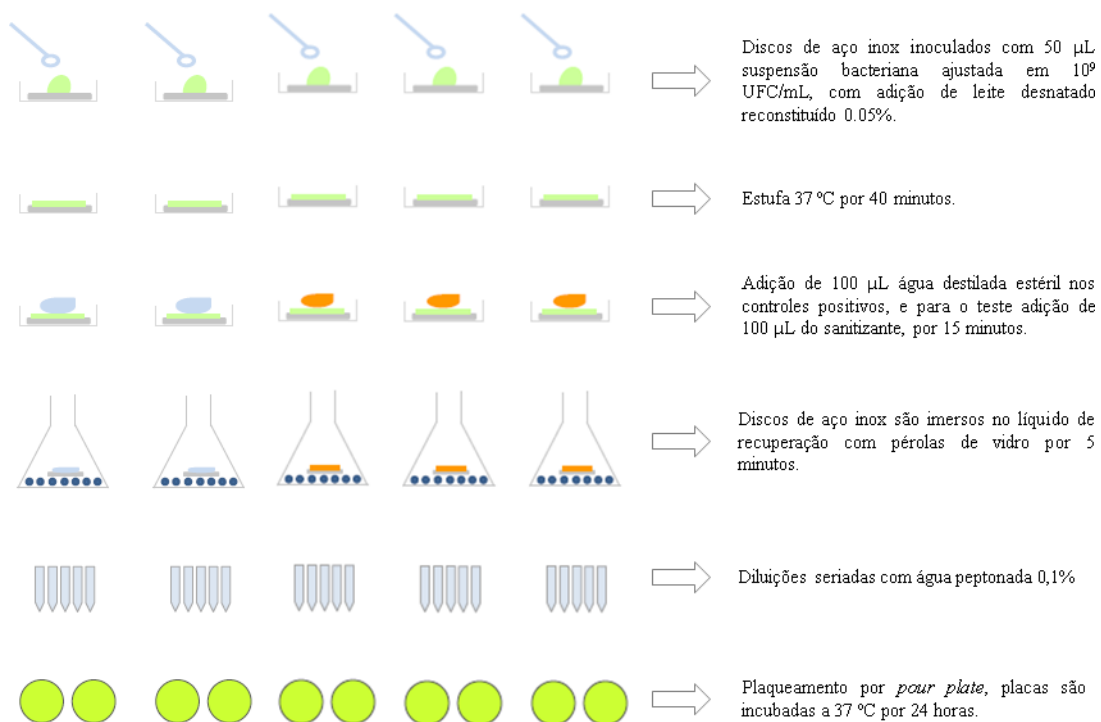


Figura 2.

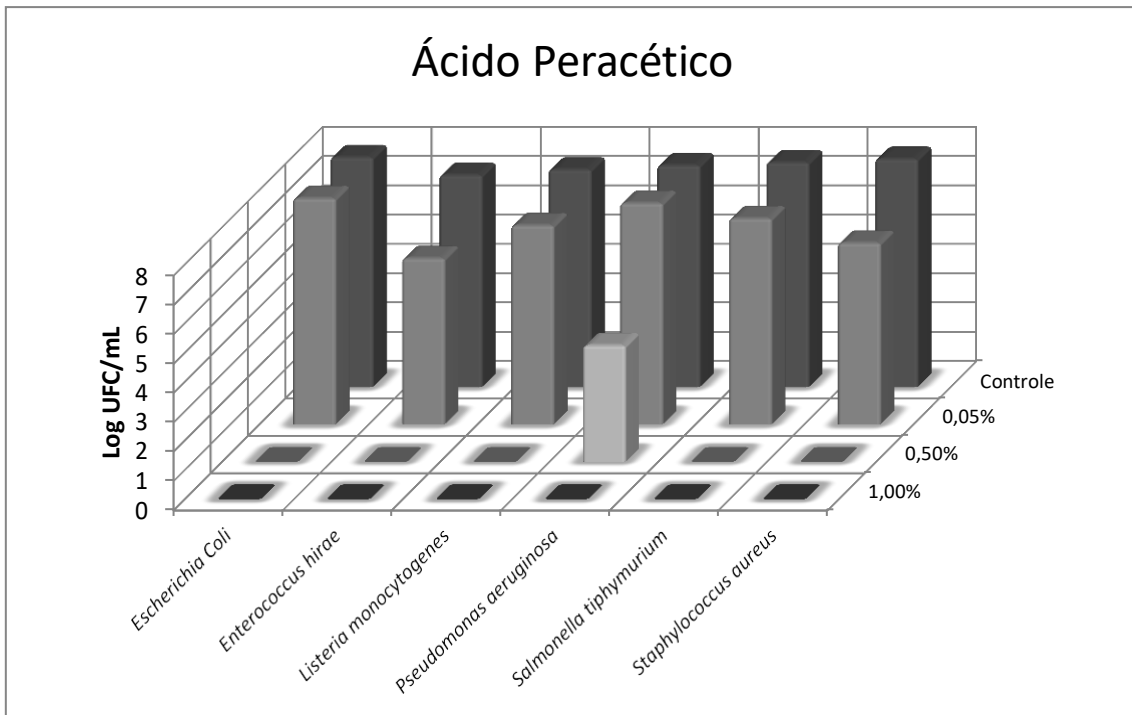


Figura 3.

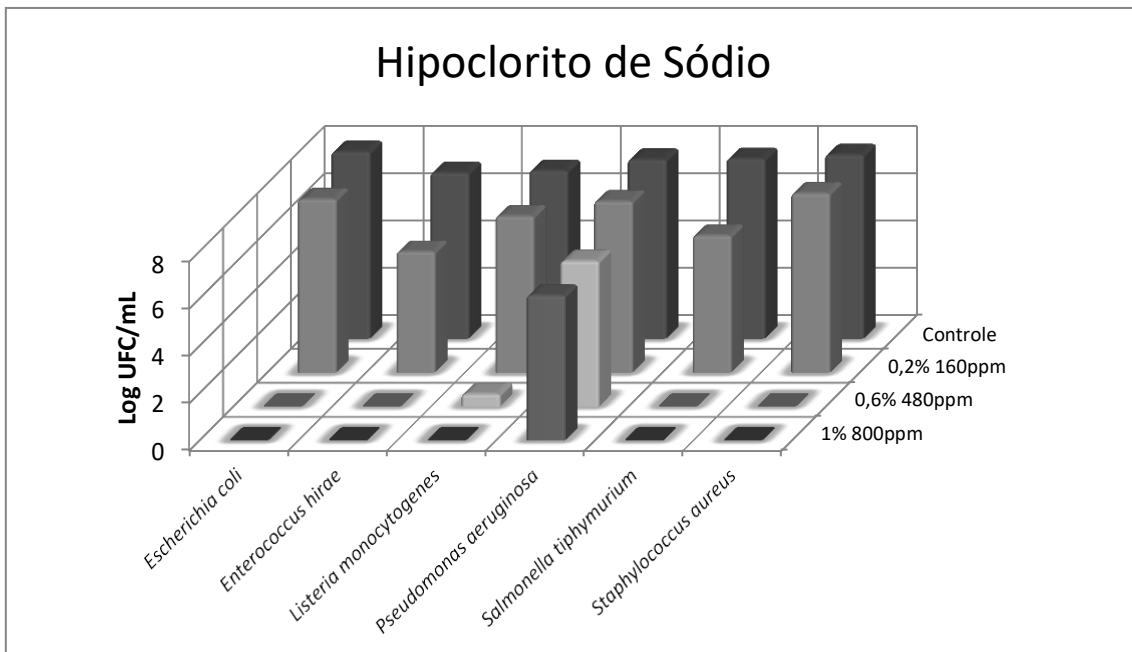
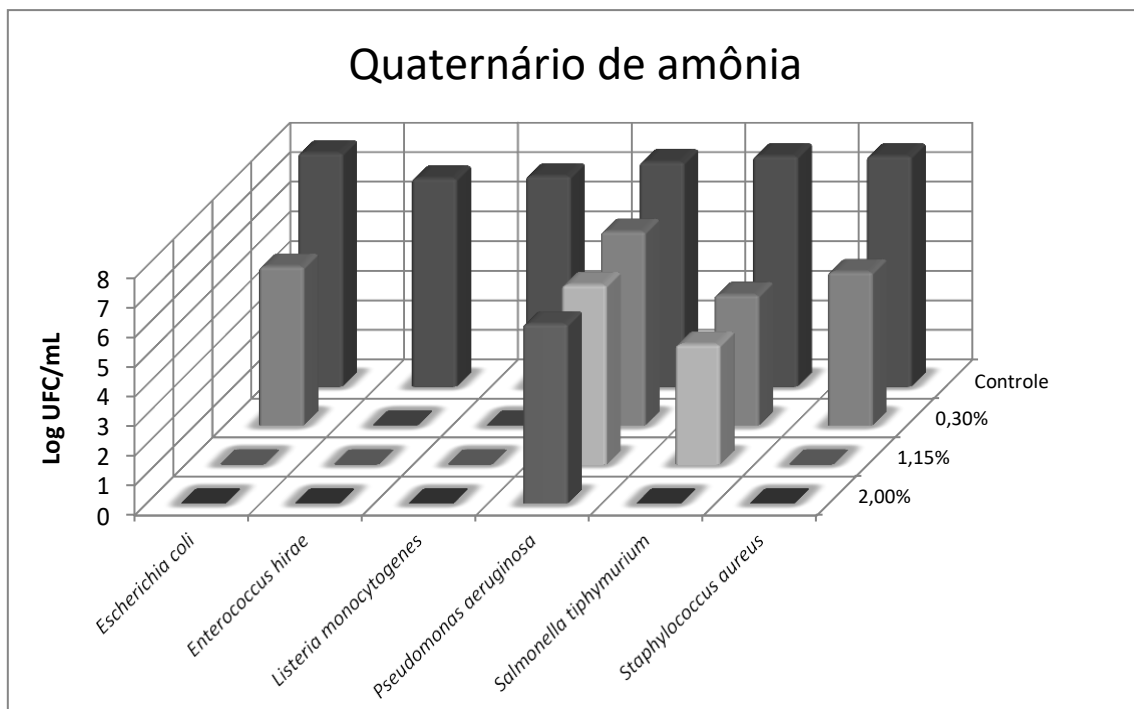


Figura 4.



5. CONCLUSÃO FINAL

Os testes com o desinfetante à base de ortofenilfenol (OPP) demonstrou eficiência na redução dos níveis de patógenos inoculados em discos de aço inoxidável. Assim, verificamos que o desinfetante fumigador à base de ortofenilfenol pode ser usado como maneira eficaz de eliminar altas concentrações de patógenos em superfícies na indústria de alimentos.

O tratamento com o sanitizante à base de ácido peracético foi eficaz na inativação de todas cepas patogênicas testadas. Hipoclorito de sódio e quaternário de amônia também foram eficazes na eliminação das bactérias testadas, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa* que apresentou uma alta resistência a esses dois sanitizantes.

Através deste trabalho, foi possível observar que alguns micro-organismos são mais resistentes a determinados princípios ativos dos sanitizantes comerciais e do fumígeno. Portanto, é relevante testar previamente o micro-organismo alvo, para direcionar o desinfetante a concentração apropriada para controlá-lo.

REFERÊNCIAS

AFNOR, NF T72- 281 (2014). NF T72- 281. Procédés de désinfection des surfaces para voie aérienne - Détermination de l'activité bactéricide, fongicide, levuricide, mycobactéricide, tuberculocide sporicide et virucide incluant les bactériophages.

AHMED, S.; COWDEN, J. An outbreak of *E. coli* O157 in central Scotland. In: **International symposium and workshop on shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* infections**, Baltimore, 1997.

AKINBOBOLA, A. B. et al. Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in in-vitro biofilms to high-level peracetic acid disinfection. **Journal of Hospital Infection**, v. 97, n. 2, p. 162–168, 2017.

AMSON, G. V.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamento de dados epidemiológicos relativos a ocorrências/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no Estado do Paraná - Brasil, no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p. 1139-1145, 2006.

ANDRADE, J. N. **Higienização na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo, Varela, 2008.

BANNERMAN, T. L. A; PEACOCK, S. J. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalasepositive cocci. In. *Manual of Clinical Microbiology*, Murray, P. R.; Baron, E. J.; Jorgensen, J. H.; Landry, M. L.; Pfaller, M. A. **ASM Press**. Washington, D.C. p. 390-411. 2007.

BELOIN, C.; ROUX, A.; GHIGO, J.-M. *Escherichia coli* biofilms. In: Romeo, T. (Ed.), **Bacterial Biofilms**. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, p. 249–289, 2008.

BLOCK, S. S. **Disinfection, Sterilization and Preservation**. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins, 5ª Ed. 1481 p., 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC n° 216, de 15 de setembro de 2004.** Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC n° 14, de 28 de fevereiro de 2007.** Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul através da Resolução GMC n° 50/06. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 2004.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária.** Análise Epidemiológica dos Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 2018.

BRENT, J. Effective Sanitation Programs for Food Safety Success. **Food Quality & Safety.** 2006. Available from: <<https://www.foodqualityandsafety.com/article/effective-sanitation-programs/>>. Accessed: Feb. 22, 2019.

CARMO, G. M. I.; OLIVEIRA, A. A.; DIMECH, C. P.; SANTOS, D. A.; ALMEIDA, L. G.; BERTO, L. H.; ALVES, R. M. S.; CARMO, E. H. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil, 1999-2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, v. 6, p. 1-7, 2005.

CARRASCO E. et al. Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review. *Food Research International.* 45, p. 545-556, 2012.

Center for Disease Control and Prevention. Peracetic Acid Sterilization Overview, 2016. Available from: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/sterilization/peracetic-acid.html>. Accessed: Jan. 12, 2019.

DeQUEIROZ, G.A.; DAY, D.F. Disinfection of Bacillus subtilis spore-contaminated Surface materials with a sodium hypochlorite and a hydrogen peroxide-based sanitizer. **Letters in Applied Microbiology.** 46 (2008), p. 176–180.

FUKUSAKI, S. Mechanims of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. **Biocontrole Science**. 11 (4). Okayama, Japon 147-57 2006

EUROPEAN STANDARD, n. 13697. Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and institutional areas - Test method and requirements without mechanical action (phase 2, step 2). 2001.

EUZÉBY, J.P. **List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus *Staphylococcus***, 2008.

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2000. 652p.

FACKLAM, R. R.; COLLINS, M. D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. **J. Clin. Microbiol.**, v. 27, p. 731 – 734, 1989.

FACKLAM, R. R.; SAHM, M. D.; TEIXEIRA, L. M. *Enterococcus*. In: Murray, B. E., Baron, E. J., Pfaller, M. A., Tenover, F. C., Tenover, R. H. (eds.) **Manual of Clinical Microbiology**, 7^a Ed. **American Society for Microbiology Press**. Washington DC, p. 297 - 305, 1999.

FARBER, J. . M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*: a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476–511, 1991.

FLEETWOOD, J. et al. As clean as they look? Food hygiene inspection scores , microbiological contamination , and foodborne illness. **Food Control**, v. 96, n. August 2018, p. 76–86, 2019.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre, 2013.

GAD, S. C. Peracetic Acid. **Encyclopedia of Toxicology**, p. 788–790, 1 jan. 2014.

GARMORY, H. S., BROWN, K. A., TITBALL, R. W. *Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. **Microbiology Reviews**, v. 26, p. 339–353, 2002.

GAST, R. K. *Salmonella* infections – Paratyphoid infections. In: **Disease of Poultry**. 12^a Ed. Iowa. p. 636-665, 2008.

GERBA, C. P. Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application. **Appl. Environ. Microbiol.** Tucson, Arizona, v-2, 81, p. 464-469, 2015.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2^a ed. São Paulo: Varela, 2003.

GREZZI, G. **Limpeza e Desinfecção na Avicultura**, 2009.

HERNANDO, V.; ARRANZ, L. N.; CATALÁN, S.; GÓMEZ, P.; HIDALGO, C.; BARRASA, A. et al. Investigación de una toxiinfección alimentaria en un centro penitenciario de alta ocupación. **Gac Sanit.**, v. 21, n. 6, p. 452-457, 2007.

HOFFMANN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VINTURIM, T. M. Determinação da atividade antibacteriana de desinfetantes. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 9, n. 39, p. 29-34, 1995.

HOLT, G. H.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. Grampositive cocci. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9^a Ed. **Willians & Wilkins**, Baltimore, USA, p. 532-558, 1994.

JARLOV, J. O. Phenotypic characteristics of coagulase-negative staphylococci: typing and antibiotic susceptibility. **APMIS**, v. 107, p. 1S-42S, 1999.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.

AY Kuaye. **Limpeza e Sanitização na Indústria de Alimentos**, Rio de Janeiro, 4ª Ed., 2017.

JUNG, M.J.; NAM, Y.D., ROH, S.W., BAE, J.W. Convergência inesperada de comunidades fúngicas e bacterianas durante a fermentação de bebidas alcoólicas coreanas tradicionais inoculadas com várias entradas naturais. **Alimentos Microbiol** , v. 30, p. 112 – 123, 2012.

KIM, J. et al. Comparison of the Antimicrobial Effects of Chlorine , Silver Ion , and Tobramycin on Biofilm □. **Antimicrobial Agents an Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1446–1453, 2008.

LIU, Y. et al. Biofilm Formation Characteristics of *Pseudomonas lundensis* Isolated from Meat. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 12, p. M2904–M2910, 2015.

LOGAN, N. A. Bacterial systematics. **Blackwell scientific publications**, Oxford, 263 p. 1994.

LOPEZ, J. Evaluation of Dairy and Food Plant Sanitizers against *Salmonella typhimorium* and *Listeria Monocytogenes*. **Journal of Dairy Science**. 69. p. 2791-2796, 1986.

MAIJALA, R.; RANTA, J.; SEUNA, E. The efficiency of the Finnish *Salmonella* Control Programme. **Food Control**, v. 16, n. 8, p. 669-675, 2005.

MANI-LÓPEZ, E. et al. Organic acids as antimicrobials to control *Salmonella* in meat and poultry products. **Food Research International**. 45, p. 713-721, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.04.043>.

MENDES, A. A. et al. Produção de Frangos de Corte. Campinas, FACTA, **Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Agrícola**, Cap. 8, p.117- 119. Cap. 11, p.171- 173, 2004.

MENDES, B.; OLIVEIRA, J. F. S. Qualidade da água para consumo humano. Lisboa, Lidel - **Edições Técnicas**, p. 570 - 571, 2004.

NALÉRIO, É. S. et al. *Listeria monocytogenes*: monitoramento desse perigo biológico na cadeia produtiva de frangos do sul do Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 3, p. 626–630, 2009.

NASCIMENTO, F. C. A. Aspectos sócio-econômicos das doenças veiculadas pelos alimentos. **Nutrição em pauta**, v. 40, p. 22-26, 2000.

NIH. National Institute of Health. Foodborne Illnesses. <https://www.niddk.nih.gov/health-information/digestive-diseases/foodborne-illnesses>. Accessed Jan.12, 2019

RÊGO, J. C.; FARO, Z. P. **Manual de limpeza e desinfecção para unidades produtoras de refeições**. São Paulo: Varela, 1999.

RILEY, L.W. The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 41, p. 383-407, 1987.

RILEY, L.W.; REMIS, R. S.; HELGERSON, S. D.; MCGEE, H. B.; WELLS, J. G.; DAVIS, B. R.; HEBERT, R. J.; OLCOTT, E. S.; JOHNSON, L. M.; HARGRETT, N. T.; BLAKE, P. A.; COHEN, M. L. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 308, n. 12, p. 681-685, 1983.

ROOD, J. I.; COLE, S. T. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens*. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 4, p. 621-48, 1991.

ROVIRA, J. Sanitization. In. CABALLERO B., FINGLAS P. M., TOLDRÁ F., **Encyclopedia of Food and Health**, Academic Press. Kokomo, p. 706-713, 2016.

SHARIF, M. K. et al. Chapter 15 - Foodborne Illness: Threats and Control, In Handbook of Food Bioengineering, Foodborne Diseases, 2018, p. 501-523.

SMITH, T.; JARVIS, W. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus aureus*. **Microb. Infect.** v. 1, p. 795-805, 1999.

SPINOSA, H.; GORNIK, S.; BERNARDI, M. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. 4ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap.35, p. 441-447, 2006.

SREBERNICH, S. M. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, SP, v. 27, n. 4, out.-dez., 2007.

STOICA, M. **Sustainable Sanitation in the Food Industry**. [s.l.] Elsevier Inc., 2018.

TEIXEIRA, L. M.; FACKLAM, R. R. *Enterococcus*. In: Murray, B. E. , Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. C., Tenover, R. H. (eds.), **Manual of Clinical Microbiology** 8ª Ed. **American Society for Microbiology Press**. Washington, DC, EUA, 2003.

TEZEL, U.; PAVLOSTATHIS S. G., Quaternary ammonium disinfectants: microbial adaptation, degradation and ecology. **Current Opinion in Biotechnology**. V-33, p. 296-304, 2015.

TINOCO, J. et al. Antisépticos y desinfectantes: apuntando al uso racional. Recomendaciones del Comité Consultivo de Infecciones Asociadas a la Atención de Salud, Sociedad Chilena de Infectología. **Revista chilena de infectología**, v. 34, n. 2, p. 156–174, 2017.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 4º Ed., 269-310, 2004.

WESSELS, S.; INGMER, H. Modes of action of three disinfectant active substances: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. Fredensborg, Denmark, v. 67, p. 456-467, 2013.

