

UNIVERSIDADE REGIONAL INTEGRADA DO ALTO URUGUAI E DAS MISSÕES
URI - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SANITIZANTES UTILIZADOS PELAS
INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS**

CEZAR AUGUSTO BELTRAME

ERECHIM, RS – BRASIL

JUNHO DE 2009

URI - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SANITIZANTES UTILIZADOS PELAS
INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS**

CEZAR AUGUSTO BELTRAME

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL

JUNHO DE 2009

Avaliação da eficiência de sanitizantes utilizados pelas indústrias de alimentos

Cezar Augusto Beltrame

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Julgadora do Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos.

Comissão Julgadora:

Prof. Geciane Toniazzo, D. Sc.
Orientadora

Prof. Rogério Luis Cansian, D. Sc
Orientador

Prof. Elci Lotar Dickel, D. Sc.

Prof. Débora de Oliveira, D. Sc

Erechim, 26 de junho de 2009.

Ficha catalográfica

Dedico este trabalho as pessoas que durante a minha vida tem me dado apoio e de uma forma ou outra estão sempre presentes nas minhas conquistas.

Aos meus pais, Waldemar Beltrame e Arnilda Karsten Beltrame, aos meus irmãos, Carlos Alberto, Carmen Regina, Cladis Salete, Clair de Fátima, Paulo Roberto, Claiton André, Angelo Ernesto, Jeanderson Luis.

A minha esposa Simone pelo amor e pela compreensão das ausências.

Ao meu enteado Guilherme pelo companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Aurora Alimentos pelo apoio e incentivo ao meu crescimento profissional.

A Ana Luiza, ao Sergio, ao Jean pelo apoio e grande contribuição na realização dos trabalhos.

Ao Prof. Cansian e a Profa. Geciane pelas orientações que muito ajudaram na execução e finalização do trabalho.

A todas as pessoas que colaboraram de alguma forma, na realização deste projeto.

E finalmente aos meus grandes amigos Rodrigo e Roger pelos estudos e churrascos, pelo apoio nas horas difíceis e pela grande amizade que se firmou mais ainda neste período.

“Para alcançar o conhecimento, acrescente coisas todos os dias.

Para alcançar a sabedoria, remova coisas todos os dias.”

(Lao Tse)

Resumo da Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos.

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE SANITIZANTES UTILIZADOS PELAS INDÚSTRIAS DE ALIMENTOS

Cezar Augusto Beltrame

Junho/2009

Orientadores: Geciane Toniazzo e Rogério L. Cansian.

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficiência de quatro sanitizantes, ácido peracético, clorexidina, quaternário de amônio e uma mistura de ácidos orgânicos, frente a quatro bactérias reconhecidas como problema para a indústria cárnea, *Salmonella* sp., *S. aureus*, *E. coli* e *L. monocytogenes*. Foram avaliadas diferentes concentrações de sanitizantes (0,2; 0,5; 0,6; 1,0; 1,1 e 1,4%), com diferentes temperaturas (10 e 45°C) de preparo da solução e diferentes tempos de contato (2; 10; 15; 18; 25 min). Foram realizados testes em uma planta industrial com os melhores resultados de concentrações, temperaturas e tempo de contato obtidos na primeira etapa, medindo-se a contagem total de mesófilos na superfície antes da aplicação do sanitizante e posterior a aplicação do mesmo. Foram avaliadas as curvas cinéticas de letalidade de *L. monocytogenes* em diferentes tempos (0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12,5, 15, 18 e 20 minutos) e concentrações de clorexidina (2,0 mL L⁻¹, 1,0 mL L⁻¹ e 0,5 mL L⁻¹), determinando os respectivos valores D, permitindo calcular o valor Z e os diferentes valores F. Em uma última etapa foi realizada uma simulação de análise de custos, com diferentes combinações de uso dos sanitizantes. Para os quatro microrganismos estudados foram feitas 5 simulações: a primeira sem um rodízio entre os sanitizantes, no segundo caso com rodízio entre os sanitizantes, no terceiro caso sem a utilização do ácido peracético, no quarto caso criou-se uma simulação para controle de *E. coli*, utilizando a clorexidina e o ácido peracético e no último caso uma alternativa para controle de *Listeria* utilizando-se o ácido peracético e o *blend* de ácidos orgânicos. Na avaliação da eficiência de diferentes sanitizantes, o ácido peracético obteve alta eficiência com a menor concentração (0,2%) e o menor tempo de contato (2 minutos) a 10°C. As concentrações de clorexidina e quaternário de amônio são semelhantes, porém o tempo de contato necessário é distinto (2 e 10 minutos respectivamente). Os ácidos orgânicos necessitam alta concentração (1%) e maior tempo de contato (15 minutos) para alcançar uma performance semelhante. O ácido peracético é mais eficiente quando aplicado a 10°C do que quando aplicado a 45°C. Nos testes em planta industrial, foi possível verificar que o ácido peracético teve um desempenho bom mesmo em concentrações e tempos abaixo dos recomendados pelos fornecedores, o quaternário de amônio teve bom desempenho na concentração recomendada pelo fornecedor porém mostrou-se eficiente num tempo mais curto. A clorexidina e o quaternário de amônio tiveram bom desempenho nas concentrações e tempos recomendados pelos fornecedores, sendo que ambos podem ser aplicados para controle dos microrganismos testados, já os ácidos orgânicos não apresentaram eficiência mesmo em concentrações e tempos superiores aos recomendados pelos fornecedores frente ao *Staphylococcus aureus*. A regressão linear entre o Log de UFC de *L. monocytogenes* e o tempo em minutos com clorexidina a 0,2%, 0,1% e 0,05%, permitiu determinar os valores D nestas concentrações obtendo-se 1,38, 3,087 e 4,81 minutos, respectivamente, fornecendo um valor Z de -0,2788. Os resultados relacionados a inativação de *L. monocytogenes* indicam um comportamento linear do tempo de redução decimal deste microrganismo frente à clorexidina. Dentre os sanitizantes testados o ácido peracético apresentou a melhor relação custo benefício, sendo o indicado para controle de todos os microrganismos testados.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master in Food Engineering

EVALUATION OF EFFICIENCY OF SANITIZERS USED BY THE FOOD INDUSTRY

Cezar Augusto Beltrame

June/2009

Advisors: Geciane Toniazzo and Rogério L. Cansian.

This study aimed to evaluate the effectiveness of four sanitizers, peracetic acid, chlorhexidine, quaternary ammonium and a mixture of organic acids against four bacteria which are known as a problem for the meat industry, *Salmonella* sp., *S. aureus*, *E. coli* and *L. monocytogenes*. It was evaluated different sanitizers concentrations (0.2, 0.5, 0.6, 1.0, 1.1 and 1.4%), with different temperatures (10 and 45°C) for the solution preparation and different contact times (2, 10, 15; 18, 25). The tests were made in an industrial plant with the best results of concentrations, temperatures and contact time obtained in the first step, measuring the total count of mesofilos on the surface before applying the sanitizer and after application of it. It was evaluated the lethality of the kinetic curves of *L. monocytogenes* at different times (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12.5, 15, 18 and 20 minutes) and concentrations of chlorhexidine (2,0 mL L⁻¹, 1.0 mL L⁻¹ and 0.5 mL L⁻¹), determining the respective values of D, which allowed the calculation of Z value and the different values of F. In a last step it was performed a simulation analysis of costs, with different combinations of sanitizers use. For the four microorganisms studied, were performed 5 simulations: the first without a rotation of sanitizers, in the second case, with the rotation of sanitizers, in the third case without the use of peracetic acid, in the fourth case it was created a simulation to control of *E. coli*, using the chlorhexidine and the peracetic acid and at the last case, it was developed an alternative to control the *Listeria* using peracetic acid and the blend of organic acids. In the evaluation of the different sanitizers efficacy, the peracetic acid showed high efficiency with the lowest concentration (0.2%) and the lowest contact time (2 minutes) at 10°C. The concentrations of chlorhexidine and quaternary ammonium are similar, however the contact time needed is different (2 and 10 minutes respectively). The organic acids require high concentration (1%) and higher contact time (15 minutes) to achieve a similar performance. The peracetic acid is more efficient when it is applied at 10°C than when applied at 45°C. In the tests at an industrial plant, it was possible to observe that the peracetic acid had a good performance even at concentrations and times below those recommended by the suppliers, the quaternary ammonium had a good performance in the concentration recommended by the supplier but it was efficient in a shorter time. The chlorhexidine and quaternary ammonium showed a good performance in the concentrations and times recommended by the suppliers, both can be applied for the control of the microorganisms tested, while the organic acids showed no efficiency even at concentrations and longer time than those recommended by the suppliers in comparison to the *Staphylococcus aureus*. The linear regression between the log of CFU of *L. monocytogenes* and the time in minutes with chlorhexidine at 0.2%, 0.1% and 0.05%, was used to calculate the values of D in these concentrations resulting in 1.38, 3.087 and 4.81 minutes, respectively, providing a value Z of -0.2788. The results regarding the inactivation of *L. monocytogenes* indicate a linear behavior of the decimal reduction time of this microorganism in comparison to the chlorhexidine. Among the sanitizers tested the peracetic acid showed the best result in cost and benefits and therefore it is indicated for the control of all microorganisms tested.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	viii
SUMÁRIO.....	ix
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Importância da higienização em plantas processadoras de carnes	19
2.2 Princípios ativos	21
2.2.1 Ácido Peracético	22
2.2.2 Clorexidina	23
2.2.3 Quaternário de Amônio	23
2.2.4 Ácidos Orgânicos	24
2.3 Bactérias	25
2.3.1 <i>Salmonella</i> spp.....	26
2.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	26
2.3.3 <i>Escherichia coli</i>	28
2.3.4 <i>Staphylococcus aureus</i>	28
2.4 Inativação de <i>Listeria monocytogenes</i> em suspensão, usando clorexidina como agente ativo.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1 Avaliação da eficiência de quatro princípios ativos utilizados nas indústrias de alimentos.....	32
3.2 Testes em planta industrial: Avaliação da eficiência dos quatro sanitizantes.....	34

3.3 Cinética de inativação de <i>Listeria monocytogenes</i> em suspensão, usando clorexidina como agente ativo	36
3.4 Análise de custos dos diferentes sanitizantes	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 Avaliação da eficiência de quatro princípios ativos utilizados nas indústrias de alimentos	39
4.1.1 Avaliação qualitativa da eficiência do ácido peracético	39
4.1.2 Avaliação qualitativa da eficiência da clorexidina	41
4.1.3. Avaliação qualitativa da eficiência de quaternário de amônia	43
4.1.4. Avaliação qualitativa da eficiência de ácidos orgânicos	45
4.1.5. Avaliação qualitativa da eficiência dos sanitizantes sobre os diferentes microrganismos avaliados	49
<i>Salmonella choleraesuis</i>	49
<i>Staphylococcus aureus</i>	51
<i>Escherichia coli</i>	52
<i>Listeria monocytogenes</i>	54
4.2 Testes em planta industrial: Avaliação da eficiência de quatro sanitizantes	56
4.2.1 Ácido Peracético	56
4.2.2 Clorexidina	56
4.2.3 Quaternário de Amônio	57
4.2.4 Ácidos Orgânicos	58
4.3 Cinética de inativação de <i>Listeria monocytogenes</i> em suspensão, usando clorexidina como agente ativo	59
4.4 Análise de custos	62
4.4.1 Simulação 1	62
4.4.2 Simulação 2	62

4.4.3 Simulação 3.....	63
4.4.4 Simulação 4.....	63
4.4.5 Simulação 5.....	64
5. CONCLUSÕES	66
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	67
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração de princípio ativo dos sanitizantes comerciais avaliados..	32
Tabela 2 - Concentrações (% do produto comercial) e tempos de contato (minutos) dos diferentes sanitizantes avaliados.....	33
Tabela 3 - Combinação de concentração, tempo de contato e temperatura para utilização eficiente dos diferentes sanitizantes.....	35
Tabela 4 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição do ácido peracético a 10°C sobre as bactérias testadas.....	39
Tabela 5 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição do ácido peracético a 45°C sobre as bactérias testadas.....	40
Tabela 6 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição de clorexidina a 10°C sobre as bactérias testadas.....	41
Tabela 7 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição de clorexidina a 45°C sobre as bactérias testadas.....	42
Tabela 8 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição de quaternário de amônia a 10°C sobre as bactérias testadas.....	43
Tabela 9 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição de quaternário de amônia a 45°C sobre as bactérias testadas.....	44
Tabela 10 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição de ácidos orgânicos a 10°C sobre as bactérias testadas.....	45
Tabela 11 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição de ácidos orgânicos a 45°C sobre as bactérias testadas.....	46
Tabela 12 - Valores de pH para diferentes concentrações da solução de ácidos orgânicos.....	48
Tabela 13 - Relação entre o pH e o percentual de ácidos na forma não dissociada.	48
Tabela 13 - Eficiência dos sanitizantes sobre <i>Salmonella choleraesuis</i> em diferentes temperaturas, concentrações e tempos de contato.....	50
Tabela 15 - Eficiência dos sanitizantes sobre <i>Staphylococcus aureus</i> em diferentes temperaturas, concentrações e tempos de contato.....	52
Tabela 16 - Eficiência dos sanitizantes sobre <i>Escherichia coli</i> em diferentes temperaturas, concentrações e tempos de contato.....	53
Tabela 17 - Eficiência dos sanitizantes sobre <i>Listeria monocytogenes</i> em diferentes temperaturas, concentrações e tempos de contato.....	55

- Tabela 18** – Análise de custo semanal utilizando ácido peracético a 10°C por 2 minutos na concentração de 0,2%. 62
- Tabela 19** - Análise de custo semanal utilizando ácido peracético na concentração de 0,2% e quaternário de amônio com concentração de 0,6%. 63
- Tabela 20** - Análise de custo semanal utilizando clorexidina na concentração de 0,5% e quaternário de amônio com concentração de 0,6%. 63
- Tabela 21** - Análise de custo semanal utilizando ácido peracético na concentração de 0,2% e clorexidina com concentração de 0,5%. 64
- Tabela 22** - Análise de custo semanal utilizando ácido peracético na concentração de 0,2% e ácidos orgânicos com concentração de 0,6%. 64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Percentual de eficiência comparativa de diferentes concentrações e tempos de exposição do ácido peracético a 10°C e 45°C.....	40
Figura 2 - Percentual de eficiência comparativa de diferentes concentrações e tempos de exposição da clorexidina a 10°C e 45°C.....	42
Figura 3 - Percentual de eficiência comparativa de diferentes concentrações e tempos de exposição de quaternário de amônia a 10°C e 45°C.....	44
Figura 4 - Percentual de eficiência comparativa de diferentes concentrações e tempos de exposição de ácidos orgânicos a 10°C e 45°C.....	47
Figura 5 - Comparativo de eficiência dos diferentes sanitizantes sobre <i>Salmonella choleraesuis</i>	49
Figura 6 - Comparativo de eficiência dos diferentes sanitizantes sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	51
Figura 7 - Comparativo de eficiência dos diferentes sanitizantes sobre <i>Escherichia coli</i>	53
Figura 8 - Comparativo de eficiência dos diferentes sanitizantes sobre <i>Listeria monocytogenes</i>	54
Figura 9 - Contagem total de microrganismos heterotróficos (UFC/20cm ²) antes e depois da sanitização com ácido peracético.....	56
Figura 10 - Contagem total de microrganismos heterotróficos (UFC/20cm ²) antes e depois da sanitização com clorexidina.....	57
Figura 11 - Contagem total de microrganismos heterotróficos (UFC/20cm ²) antes e depois da sanitização com quaternário de amônio.....	57
Figura 12 - Contagem total de microrganismos heterotróficos (UFC/20cm ²) antes e depois da sanitização com ácidos.....	58
Figura 13 - Regressão linear entre o Log de UFC de <i>L. monocytogenes</i> e o tempo em minutos com clorexidina a 0,2%.....	59
Figura 14 - Regressão linear entre o Log de UFC de <i>L. monocytogenes</i> e o tempo em minutos com clorexidina a 0,1%.....	60
Figura 15 - Regressão linear entre o Log de UFC de <i>L. monocytogenes</i> e o tempo em minutos com clorexidina a 0,05%.....	60
Figura 16 - Regressão linear entre o Log dos valores D de <i>L. monocytogenes</i> em relação às concentrações de clorexidina testadas.....	61

Figura 17 - Regressão linear entre o Log dos valores D de *L. monocytogenes* em relação às concentrações de clorexidina testadas e calculadas a partir do valor Z. .61

Figura 18 - Custo semanal do uso de diferentes combinações de sanitizantes.65

1. INTRODUÇÃO

A garantia de consumo de um alimento com segurança é uma das principais preocupações mundiais no momento, seja por parte dos consumidores, seja por parte dos governos que procuram legislar de forma a que as empresas produtoras garantam seus processos e produtos.

Muitos acordos comerciais entre países ocorrem somente após um deles ou ambos comprovarem, muitas vezes sob forma de resultados de auditorias a eficiência de seus processos produtivos, ou seja, a garantia de que podem produzir alimentos seguros.

Podemos citar o acordo do Brasil com a África do Sul que prevê a ausência de *Salmonella enteritidis* nos cortes de aves exportados para aquele país (Circular 1206/2008 – CGPE/DIPOA (Coordenador Geral de Programas Especiais (CGPE) do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), Ministério da Agricultura).

Um dos processos mais controlados nas indústrias de alimentos no Brasil, principalmente nas indústrias cárneas é seu processo de higienização, tratado dentro de um programa de autocontrole chamado Programa de Procedimentos Padrões de Higiene Operacional regulamentado pelo Ministério da Agricultura, através das circulares 175 e 176 de 16 de Maio de 2005.

O Brasil não possui legislação específica que determine os padrões microbiológicos que indiquem quando uma higienização está dentro ou fora dos padrões, por este motivo a grande maioria das empresas exportadoras de produtos cárneos adota os padrões europeus que foram determinados através da Decisão 471/2001, Comissão Européia, onde os níveis são separados em aceitável, com contagem mesófilos entre 0 UFC/cm² e 10 UFC/cm² e não aceitável para contagem acima de 10 UFC/cm².

A qualidade de um processo de higienização depende de vários fatores, como uma remoção adequada de resíduos sólidos antes do enxágüe inicial, qualidade e pressão da água, qualidade do detergente aplicado, qualidade da esfrega e tipo e qualidade do sanitizante utilizado.

Uma higienização de qualidade é o primeiro passo para alcançar um produto de qualidade, ou produto com segurança alimentar, para isso as empresas devem quebrar conceitos antigos e entender que a etapa de higienização deve ser

considerada com o início do processo de produção e não o final, devem-se criar controles de modo a garantir a qualidade desejada.

A qualificação das equipes de higienização e principalmente dos responsáveis por esta equipe e pelas escolhas dos produtos utilizados deve ser uma preocupação constante das empresas. Porém, ainda hoje verifica-se que estas questões muitas vezes são deixadas em segundo plano. Deste modo muitas empresas trabalham de acordo com o que dita o mercado, ou seja, as metodologias aplicadas e os produtos utilizados muitas vezes são indicações dos fornecedores, sem uma devida avaliação da empresa, principalmente pela falta de conhecimento sobre os produtos.

Atualmente existe no mercado uma gama muito grande de produtos para sanitização e as empresas fornecedoras dos mesmos os indicam para qualquer problema, pois quase todos afirmam que a eficiência do produto é grande para vários microrganismos.

A escolha de um sanitizante adequado é muito importante para o alcance de um resultado final satisfatório nos índices microbiológicos, mas para isso é necessário um conhecimento do tipo de problema que se quer tratar e também da eficiência do sanitizante frente ao meio utilizado e aos microrganismos presentes.

A escolha dos sanitizantes também deve levar em consideração o custo da sua utilização, pois no mundo atual a competitividade entre as empresas faz com que as mesmas tenham que ser cada vez mais eficientes em seus processos, não sendo diferente na parte de higienização. Assim, um bom processo deve ter resultados visuais e microbiológicos satisfatórios, baixo custo e não pode apresentar problemas ambientais ou de residuais químicos de produtos.

Com o mercado apresentando várias alternativas fica cada vez mais clara a necessidade de se conhecer bem as mesmas, suas funcionalidades em diversas concentrações e suas interações com o meio. Porém a maioria dos materiais disponíveis para consulta vem dos próprios fornecedores dos sanitizantes, não tendo assim uma imparcialidade necessária para a validação dos dados.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de quatro princípios ativos utilizados nas indústrias, o ácido peracético, a clorexidina, o quaternário de amônio e uma mistura de ácidos orgânicos, frente a quatro bactérias reconhecidas no mercado como problema para a indústria cárnea, *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. Foram avaliadas diferentes concentrações dos produtos, temperaturas das soluções e tempos de

contato. Utilizando-se os melhores resultados da avaliação de eficiência dos sanitizantes, realizou-se testes em planta industrial, medindo-se a contagem total de mesófilos na superfície antes da aplicação do sanitizante e posterior a aplicação do sanitizante. Avaliou-se ainda a cinética de inativação de *Listeria monocytogenes* em suspensão, usando clorexidina como agente ativo, determinando os respectivos valores D, permitindo calcular o valor Z e os diferentes valores F. Também foi realizada uma análise de custos para as melhores alternativas alcançadas no trabalho.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância da higienização em plantas processadoras de carnes

As doenças transmitidas por alimentos são responsáveis atualmente pela maior parte dos surtos de toxinfecção em quase todos os países. O desenvolvimento econômico e a globalização do mercado mundial, as alterações nos hábitos alimentares, com a crescente utilização de alimentos industrializados ou preparados fora de casa, alteraram o perfil epidemiológico dessas doenças, expondo a população a vários tipos de contaminantes. Dados da DDTHA/CVE (Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar/Centro de Vigilância Epidemiológica) para o período de 1999 a 2002 mostram que cerca de 60% dos surtos de diarreia ocorridos no Estado de São Paulo foram veiculados por alimentos. Apesar de o principal local de ocorrência ser ainda o domicílio (cerca de 20%), restaurantes, refeitórios, bufês e outros serviços de alimentação têm sido responsáveis por importante percentual de surtos de diarreia ou toxinfecções alimentares (Informes Técnicos Institucionais, 2005).

A higienização na indústria de alimentos visa basicamente à preservação da pureza, da palatabilidade e da qualidade microbiológica dos alimentos. Auxilia, portanto, na obtenção de um produto que, além das qualidades nutricionais e sensoriais, tenha uma boa condição higiênico-sanitária, não oferecendo riscos à saúde do consumidor. Assim, contribui decisivamente para a produção de alimentos dentro dos padrões microbiológicos recomendados pela legislação. A produção de alimentos seguindo normas adequadas de controle de qualidade pode viabilizar os custos de produção e satisfaz aos anseios dos consumidores (ANDRADE & MACEDO, 1996).

Uma das conseqüências mais graves da má higienização nas indústrias de alimentos é a possível ocorrência de doenças de origem alimentar. Este é um dos problemas que mais afligem os responsáveis pela qualidade dos alimentos comercializados. Cerca de 200 doenças podem ser veiculadas pelos alimentos. Elas são provocadas por bactérias, fungos, vírus, parasitas, agentes químicos e substâncias tóxicas de origem animal ou vegetal. As bactérias representam o grupo

de maior importância, sendo responsáveis pela ocorrência de cerca de 70% dos surtos e 90% dos casos (ANDRADE & MACEDO, 1996).

É necessário um tempo de contato entre os sanitizantes e os resíduos para que as reações químicas ocorram. A princípio, quanto maior o tempo de contato mais eficiente será a higienização. No entanto as reações químicas ocorrem com mais eficiência nos minutos iniciais da aplicação dos agentes químicos. Por outro lado, as soluções tornam-se mais saturadas com materiais originários das reações e etapas da higienização muito prolongadas aumentam o custo da higienização (ANDRADE & MACEDO, 1996).

O sistema de desinfecção quando realizado corretamente pode representar um custo aceitável com a redução dos patógenos, além de exercer um importante papel na redução dos riscos biológicos em sistema de produção integrado. A prevenção de doenças é uma situação de controle relativamente possível, enquanto que em um surto nem sempre é possível este controle. Os protocolos de desinfecção variam de acordo com a necessidade ou patógenos envolvidos. Poucos desinfetantes apresentam um espectro amplo de ação (BLOCK, 1983).

O Código Zoosanitário Internacional, ao tratar sobre o tema medidas de higiene e segurança sanitária na produção animal, alerta sobre a existência de poucos desinfetantes universais, bem como indica a necessidade de haver controle sobre a atividade biocida dos produtos existentes. Variáveis como a amostra do microrganismo de interesse e a concentração do produto recomendada pelo fabricante devem ser submetidas à avaliação para comprovar sua eficácia (DOMINGUES & LANGONI, 2001).

Para a avaliação da eficiência microbiológica dos sanitizantes utiliza-se a técnica descrita na Portaria 101 de 11/08/1993 – Anexo Parte IV – Determinações Analíticas - Ministério da Agricultura e do Abastecimento – MAPA, Brasil.

Na avaliação da eficiência de desinfetantes é necessário considerar as diluições e as condições de uso recomendadas pelo fabricante ou a serem testadas para uso comercial. Os testes devem ser conduzidos em presença de matéria orgânica (extrato de levedura a 1%, albumina bovina a 1%, soro, sangue, proteínas, leite, etc.), o que assegura que perdas no poder desinfetante ou inativação dos mesmos, nas condições de uso sejam detectadas. As diluições do desinfetante devem ser feitas em água destilada.

Alguns produtos químicos têm a capacidade de produzir lesões sub-letais em alguns microrganismos, exercendo assim, ação bacteriostática e não bactericida. O prolongamento do período de incubação (mínimo de 96 horas) e o uso de meios ricos apropriados (livres de inibidores) permite a recuperação das células com lesão fisiológica reversível. Devido a isso, os ensaios de eficiência de desinfetantes devem prever períodos de incubação nunca inferiores a 96 horas. Para procedimentos de higiene eficientes nas indústrias de alimentos, é fundamental a escolha correta dos agentes de limpeza e sanificação. Nesta seleção deve-se analisar o tipo e grau dos resíduos aderidos às superfícies, a qualidade da água empregada, a natureza da superfície a ser higienizada, os métodos de higienização aplicados e os tipos e níveis de contaminação microbiológica (ANDRADE & MACEDO, 1996).

As indústrias de alimentos possuem muitas variáveis em seus processos, como tipo da superfície de contato, capacitação das pessoas, qualidade do detergente, entre outras, que interferem nos resultados de seus processos de higiene, por isso é muito importante que os resultados obtidos em laboratórios sejam testados a campo, ou seja, nas indústrias.

2.2 Princípios ativos

Operações de higiene geralmente aplicadas na indústria de alimentos são assumidas para controlar a formação de biofilmes sobre as superfícies de contato com os alimentos (METTLER & CARPENTIER, 1998). *Salmonella* e *L. monocytogenes* aderidas são reconhecidas as mais resistentes aos sanitizantes (FRANK & KOFFI, 1990; KRYSINSKI et al., 1992; REN & FRANK 1993; RONNER & WONG, 1993; SINDE & CARBALLO, 2000).

Os biofilmes, complexos ecossistemas microbianos, podem ser formados por populações desenvolvidas a partir de uma única, ou de múltiplas espécies, podendo ser encontrados em uma variedade de superfícies bióticas e/ou abióticas. Desta maneira, muitos autores definem biofilmes como associações de microrganismos e de seus produtos extracelulares, que se encontram aderidos a superfícies bióticas ou abióticas. Geralmente, a dinâmica de formação de um biofilme ocorre em etapas distintas. Inicialmente temos os organismos denominados colonizadores primários, que se aderem a uma superfície, geralmente contendo proteínas ou outros compostos orgânicos. As células aderidas passam a se desenvolver, originando

microcolônias que sintetizam uma matriz exopolissacarídica (EPS), que passam a atuar como substrato para a aderência de microrganismos denominados colonizadores secundários. Estes colonizadores secundários podem se aderir diretamente aos primários, ou promoverem a formação de coagregados com outros microrganismos e então se aderirem aos primários. Portanto, uma abordagem para o problema das bactérias formadoras de biofilmes na indústria de alimentos é evitar adesão das bactérias as superfícies.

Existem várias opções de sanitizantes no mercado, sendo que os princípios ativos mais utilizados são o ácido peracético e o quaternário de amônia, uma terceira alternativa utilizada é a clorexidina, sendo que recentemente estão surgindo no mercado produtos a base de ácidos orgânicos, que seriam produtos mais seguros com relação a resíduos em alimentos.

2.2.1 Ácido Peracético

É um produto constituído de uma mistura estabilizada de ácido peracético, peróxido de hidrogênio, ácido acético e um veículo estabilizante. É a grande capacidade de oxidação dos componentes celulares que torna o ácido peracético um excelente sanificante. Esse agente não existe como uma única entidade química, estando em solução em equilíbrio com o peróxido de hidrogênio e o ácido acético. Assim, embora as recomendações dos fabricantes sejam baseadas na concentração do ácido peracético, não há dúvidas que a ação sobre as células vegetativas e também sobre esporos bacterianos, fungos, leveduras e vírus é também devido ao teor de peróxido de hidrogênio presente nas formulações comerciais (ANDRADE & MACEDO, 1996).

Observa-se na literatura o crescente aumento de pesquisas utilizando ácido peracético, considerado um agente biocida potente, mesmo em baixas concentrações (0,0001% a 0,2%). O ácido peracético apresenta como principais vantagens o fato de permanecer ativo mesmo na presença de matéria orgânica, apresentar como produto de decomposição substâncias não tóxicas (ácido acético e oxigênio) e não-mutagênicas, possuir baixa dependência de pH e necessitar de pouco tempo de contato para promover uma efetiva desinfecção (SILVA et al., 2008).

2.2.2 Clorexidina

A clorexidina é uma substância química que foi introduzida há muitos anos como anti-séptico de largo espectro contra bactérias Gram-positivas e negativas (DAVIES et al., 1954).

É uma biguandina com propriedades catiônicas. Quimicamente é classificada como Digluconato de Clorexidina, molécula estável que quando ingerida é excretada pelas vias normais, sendo que a pequena porcentagem retida no organismo não é tóxica. Quando em baixas concentrações, provoca lixiviação de substâncias de pequeno peso molecular, como o potássio e o fósforo, exercendo efeito bacteriostático e bactericida em altas concentrações (DENTON, 1991).

O mecanismo de ação da clorexidina se caracteriza pela rápida absorção pelas células bacterianas, resultando em diversas modificações citológicas que afetam a permeabilidade e propriedades óticas. A quantidade do agente químico absorvida é proporcional a sua concentração, à densidade da célula bacteriana e à composição e pH do meio. Pesquisas revelam que a clorexidina reage com a célula a partir de grupamentos lipofóbicos, provocando uma desorientação de membrana lipoproteica, o que leva a uma alteração em sua função de barreira osmótica (ANDRADE & MACEDO, 1996).

2.2.3 Quaternário de Amônio

Os compostos quaternário de amônio, entre os quais se encontra o cloreto de benzalcônio, são detergentes catiônicos sintéticos que possuem atividade antimicrobiana. Possuem boa estabilidade, solubilidade em água e toxicidade relativamente baixa (PELCZAR et al., 1996).

Vários mecanismos de ação associados parecem estar relacionados, originando a atividade germicida dos compostos quaternários de amônio. Dentre estes mecanismos, estão incluídos a inativação de enzimas responsáveis pelos processos de transformação de energia, a desnaturação protéica e a lesão da membrana celular citoplasmática, com extravasamento dos constituintes celulares (ANDRADE & MACEDO, 1996; ROMÃO, 1996).

Por diminuir a tensão superficial da água, os compostos quaternário de amônio apresentam boas características de penetração tornando-se eficientes mesmo em superfícies porosas (ANDRADE & MACEDO, 1996).

Os compostos quaternários de amônia são eficientes em baixas concentrações, contra bactérias, bolores, leveduras e vírus (FRAZIER, 1972).

2.2.4 Ácidos Orgânicos

O ácido ascórbico e seus vários sais neutros e outros derivados são os principais antioxidantes usados em frutos, hortaliças e seus sucos para prevenir o escurecimento e outras reações oxidativas. Além de ser totalmente seguro para o consumo humano pode aumentar o teor de vitamina C de certos frutos e hortaliças (PRÉSTAMO & MANZANO, 1993; WILEY, 1994).

Os ácidos orgânicos têm sido amplamente utilizados principalmente no controle de *Salmonella* spp., embora exerça também um controle sobre outras bactérias. O modo de ação dos ácidos orgânicos (acético, fórmico e láctico) é atribuído a redução direta do pH intracelular por ionização dos ácidos não dissociados (BARBOSA & TORRES, 1999).

A ação inibidora dos ácidos orgânicos na forma não dissociada é de 100 a 600 vezes maior do que a forma dissociada. Os ácidos orgânicos não dissociados podem permear a membrana celular por difusão e liberar prótons no citoplasma da célula. O influxo de prótons induz a acidificação do citoplasma e dissipa o potencial de prótons da membrana (EKLUND, 1983). Isto inibe o mecanismo de transporte de substrato, geração de energia e a síntese de macromoléculas (DIEZ-GONZALES & RUSSEL, 1997).

Para Corlett Jr. e Brown (1980), citados por Silva et al. (2001), a ação antimicrobiana dos ácidos orgânicos na higienização de carnes resulta de sua ação lipofílica, durante a qual os íons de hidrogênio penetram a membrana celular do microrganismo, acidificando o seu interior e inibindo o transporte de nutrientes. Para Adams (1999) a eficácia dos ácidos orgânicos puros ou combinados é o resultado da concentração, pKa e da capacidade de quelação dos ácidos. Segundo o autor os ácidos orgânicos têm sido considerados como responsáveis pela quebra no metabolismo de aminoácidos, síntese do DNA e metabolismo energético dos microrganismos. Os ácidos diminuem o pH intracelular e podem causar alteração na permeabilidade da membrana com o bloqueio do substrato do sistema de transporte de elétrons. Os ácidos lipofílicos fracos como láctico, acético ou propiônico são capazes de passar através da membrana celular de microrganismos em seu estado

não dissociado e dissociam-se no interior da célula, produzem íons H^+ que diminuem o pH da célula. As células reagem eliminando os prótons tentando manter o pH constante e esse mecanismo faz com que o gasto energético seja maior, reduzindo o crescimento celular microbiano. Por sua vez os ânions $RCOO^-$ do ácido impedem a síntese de DNA fazendo com que a proteína não se replique (CHOCT, 2004).

2.3 Bactérias

Biofilmes bacterianos são resultado da contaminação de qualquer superfície molhada. Assim, a maioria das superfícies envolvidas no processamento dos alimentos, incluindo tubulações, tanques e máquinas são susceptíveis a formação de biofilmes. Os efeitos da colonização nas superfícies utilizadas na transformação de alimentos pode resultar na contaminação dos alimentos por microrganismos causadores de doenças associadas a alimentos ou deterioração dos alimentos (BOWER et al., 1996; HOOD & ZOTTOLA, 1995).

Segundo Busscher et al. (1995) a formação inicial de aderência bacteriana a uma superfície é um determinante para a formação de um biofilme. Por outro lado, estimula a síntese de exopolissacarídeos pelas bactérias (VANDEVIVERE & KIRCHMAN, 1993), contribuindo assim para a formação do biofilme.

Salmonella spp. e *Listeria monocytogenes* são bactérias patogênicas, que são transmitidas por alimentos. Elas podem aderir aos alimentos e materiais utilizados na transformação dos mesmos (MAFU et al., 1991; KORBER et al., 1997; WONG, 1998). No entanto, os mecanismos que regem a aderência de *Salmonella* e *L. monocytogenes* em superfícies inertes são pouco estudados. Vários estudos têm demonstrado que a aderência das bactérias depende parcialmente da natureza das superfícies e em parte das propriedades bacterianas (CARBALLO et al., 1992; CHAMBERLAIN & JOHAL, 1988; HOOD & ZOTTOLA, 1995).

2.3.1 *Salmonella* spp.

São bastonetes pequenos, Gram negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados, flagelados, oxidase e catalase positiva, patogênicos para homens e animais (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

A transmissão de *Salmonella* sp. ao homem ocorre principalmente pela ingestão de produtos de origem animal contaminados, o que pode resultar em infecções alimentares, sendo considerada uma das mais importantes causas de doença de origem alimentar entre humanos (EKPERIGIN & NAGARAJA, 1998).

O principal habitat das salmonelas é o trato intestinal de animais, tais como, aves, particularmente perus e galinhas, sendo muito comum também em suínos, bovinos e eqüinos. Carnes cruas e mal cozidas, leite cru, ovos e seus respectivos derivados, são veículos freqüentes do microrganismo, sendo freqüentes também as contaminações cruzadas de matérias primas e alimentos processados, tanto de origem animal como vegetal (GARRICK & SMITH, 1994).

Inúmeros surtos de toxinfecção alimentar causado por *Salmonella* spp. são conhecidos, envolvendo os mais variados tipos de alimentos. Verifica-se, no entanto, que a carne de aves e outros tipos de carne são mais freqüentemente envolvidos. Salmoneloses associada a laticínios são causadas por leite cru ou inadequadamente pasteurizado e também por queijo. Quanto a produtos derivados de ovos, os mais freqüentemente envolvidos em surtos são as saladas à base de ovos, sorvetes e outras sobremesas de fabricação caseira (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

2.3.2 *Listeria monocytogenes*

A *Listeria monocytogenes* é um bastonete curto, Gram positivo, anaeróbio facultativo não esporulado. É um microrganismo ambiental de ampla disseminação, psicrotrófico, capaz de crescer em temperaturas de refrigeração. A partir de 1981 foi comprovada sua transmissão pelos alimentos ao homem. A dose infectante é desconhecida, mas provavelmente baixa. Os surtos relatados são esporádicos, mas a mortalidade em geral é alta (DOYLE, 1989).

Embora as carnes frescas apresentem, geralmente, baixas contagens de *L. monocytogenes*, à medida que aumenta seu grau de processamento, aumenta o risco de contaminação (JAY, 1996).

Por esse motivo, diversos derivados cárneos têm sido envolvidos, tanto em surtos de listeriose, quanto em casos esporádicos da enfermidade (FARBER & PETERKIN, 1991; ROCOURT & COSSART, 1997).

De acordo com Jeong & Frank (1994), *L. monocytogenes* apresenta alta capacidade de colonização de superfícies e de formação de biofilmes, podendo estabelecer-se dentro de plantas de processamento de alimentos, aumentando, dessa forma, a probabilidade de contaminações cruzadas e ambientais.

Em trabalho de Silva (1996), verificou-se a presença de *Listeria* spp., inclusive de *L. monocytogenes* em plantas de processamento de lingüiças mistas do tipo frescal nos frigoríficos analisados. A presença destes microrganismos nas amostras analisadas, em especial no produto final, demonstra a necessidade de readequação nas práticas de limpeza e sanificação das plantas de processamento analisadas, bem como representa risco potencial de listeriose ao consumidor (SILVA et al., 2004).

A *L. monocytogenes* é uma bactéria capaz de se desenvolver lentamente em temperaturas de refrigeração, mas é sensível a baixos valores de pH de alimentos ácidos (iogurte e algumas frutas) e ao calor, sendo facilmente destruída pelo cozimento convencional (TOMPKIN et al., 2001).

Multiplica-se em pH entre 5,0 e 9,0 com ótimo em pH 7,0 e 7,5. É termolábil, podendo ser destruída durante o cozimento. Temperaturas como as utilizadas para pasteurização de leite a 71,7°C por 15 segundos podem inativar este microrganismo (MÜLLER & WEBER, 1996).

Encontra-se amplamente distribuída no ambiente; ela se encontra em solos, água, águas residuais e vegetação em decomposição. Comum no intestino de humanos e animais domésticos (incluindo moscas), produtos agrícolas frescos, meio ambiente da área de processamento na indústria (TOMPKIN et al., 2001). Têm sido isolada de diferentes alimentos, tais como leite cru e pasteurizado, queijo, carne bovina, suína, de aves, peixes, embutidos, carne moída de diferentes animais, produtos cárneos crus e termoprocessados, além de produtos de origem vegetal, de origem marinha, e refeições preparadas. Estes isolamentos têm sido realizados não só em outros países como também no Brasil (FRANCO & LANDGRAF, 2003). De acordo com Franchin (2008), no Brasil, trabalhos indicam a presença de *Listeria monocytogenes* em camarões (10% - região sul), filé de peixe (29,1% - região sul),

leite pasteurizado e ensacado (16,7% - região nordeste), produtos cárneos refrigerados (10% - região sudeste), e mortadelas (8% - região sudeste).

2.3.3 *Escherichia coli*

O gênero *Escherichia* contém apenas uma espécie de importância médica, que é a *Escherichia coli*, sendo esta bactéria caracterizada como um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo e capaz de crescer até temperaturas de 44°C. Pode causar infecção do trato urinário, gastroenterites, meningite neonatal e sepse (MIMS et al., 1999).

E. coli foi inicialmente introduzida como indicador em 1892 na Austrália e em 1895 nos Estados Unidos. Foi usada para indicar a contaminação da água por matéria fecal e, conseqüentemente, alertar para a presença potencial de patógenos entéricos. Da água foram estendidos aos alimentos, sem uma avaliação muito criteriosa da validade dessa aplicação em diferentes produtos. Atualmente, a premissa de que altos números de *E. coli*, coliformes termotolerantes, coliformes totais ou enterobactérias em alimentos estão correlacionados com contaminação fecal já não é válida, por uma série de razões: 1) Esses organismos não são habitantes obrigatórios do trato intestinal de animais de sangue quente, e podem ser encontrados em reservatórios ambientais; 2) São comuns nos ambientes de manufatura de alimentos, e podem tornar-se parte da microbiota residente, principalmente se as condições de limpeza são inadequadas; 3) Várias estirpes de *E. coli*, coliformes ou enterobactérias podem crescer em alimentos refrigerados (KORNACKI & JOHNSON, 2001).

2.3.4 *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus são cocos Gram positivos, arrançados em forma de cachos, anaeróbios facultativos, catalase e coagulase positiva e toleram concentrações elevadas de NaCl (até 20%). Habitam normalmente humanos e animais, colonizando a pele e vias respiratórias, podendo ser comensais ou causar infecções de pele e respiratória, encontrando-se nestes casos em grande número (DOYLE, 1989).

É um microrganismo nutricionalmente exigente, mas a carne e seus derivados preenchem suas necessidades nutricionais (DOYLE, 1989).

Em geral uma população de *S. aureus* no alimento deve atingir cerca de 10^5 a 10^6 UFC/g para a produção de quantidade suficiente de enterotoxina. A dose de toxina é baixa (0,1 a 1,0 mg/kg de peso vivo), mas é variável entre indivíduos (DOYLE, 1989).

A intoxicação alimentar por estafilococos ocorre após o consumo de alimentos contaminados com grandes quantidades de *Staphylococcus aureus* com produção das enterotoxinas as quais são termorresistentes. Assim, pode-se ter intoxicação alimentar em produtos pasteurizados onde o microrganismo foi inativado (FRANCO & LANDGRAF, 2003).

2.4 Inativação de *Listeria monocytogenes* em suspensão, usando clorexidina como agente ativo

Listeria monocytogenes tem sido considerado o mais importante patógeno transmitido por alimentos devido à alta taxa de morte em grupos de risco (THÉVENOT et al., 2005), e pela sua capacidade de sobreviver em condições adversas (VARABIOFF, 1992; INCZE, 1998; BOLTON & FRANK, 1999; BONNET & MONTVILLE, 2005).

L. monocytogenes é um patógeno mesofílico, mas com comportamento psicrotrófico. É extensamente distribuído na natureza e seu controle em alimentos é difícil devido à tolerância relativamente elevada às condições inibitórias quando comparado a outros microrganismos patogênicos transmitidos por alimentos (FARBER & PETERKIN, 1991). Geralmente são encontrados no ambiente natural do processamento de produtos alimentares como um biofilme capaz de se multiplicar em temperaturas de refrigeração (MURIAMA, 1996). Tem sido isolado de solo, vegetação, ensilagens, efluentes domésticos e industriais, água e em plantas de indústrias de alimentos (MCGLAUGHLIN, 1987), além de material fecal de mais de 40 espécies de mamíferos, e no mínimo 17 espécies de aves, incluindo frangos e patos (DONNELLY et al., 1992).

Muitos alimentos têm sido implicados em manifestações de listeriose, que incluem produtos crus e pasteurizados de leite e derivados, de carnes cruas e cozidos de diferentes animais e peixes e de vários alimentos vegetais (RYSER & MARTH, 1991).

Entretanto, a contaminação de frango congelado e refrigerado é elevada em comparação com outros alimentos (PINI & GILBERT, 1993).

Esta incidência elevada é alarmante e aumenta o risco de contaminação cruzada entre o alimento cru e cozido durante a preparação. É conseqüentemente importante planejar um programa de controle da qualidade para esta bactéria ao se processar produtos de frango (UYTTENDALE et al., 1997).

A Clorexidina é um agente catiônico (grupo biguanida; 4-chlorophenyl radical), que exibe a atividade antibacteriana. A natureza catiônica do composto promove a conexão com o composto aniônico na superfície bacteriana (grupos do fosfato do ácido teitóico em bactérias Gram-positivas e do lipopolissacarídeo nas Gram-negativas) capaz de alterar sua integridade. O íon do potássio, sendo uma entidade pequena, é a primeira substância a aparecer quando a membrana citoplasmática é danificada. A alteração da permeabilidade de membrana citoplasmática promove a precipitação de proteínas citoplásmicas, altera o balanço osmótico celular, interfere com o metabolismo, crescimento, divisão celular, inibe a ATPase da membrana e inibe o processo anaeróbico (ROLLA & MELSEN, 1975; JENKINS et al., 1988; HUGO; RUSSEL, 1992; DENTON, 1991; JEANSONNE & WHITE, 1994).

Nas indústrias que manipulam produtos de origem animal a clorexidina tem sido empregada como desinfetante de mãos, equipamentos e superfícies devido à evidências de baixa toxicidade aliadas a eficiência antimicrobiana (DOI/DIPOA, 1999; FINZI & COSTA, 1979).

A eficácia de várias soluções dos desinfetantes é medida atualmente em valores de D. O uso desta medida cresceu fora dos estudos térmicos da desinfecção, para uso nas indústrias alimentos (BALL, 1920; 1923).

A clorexidina tem sido utilizada pela indústria de alimentos como uma alternativa no processo de desinfecção da planta industrial. Entretanto, a maioria das indústrias alimentícias somente utiliza a concentração e tempo de exposição indicados pelo fornecedor do desinfetante, não possuindo as informações necessárias para poder alterar a concentração ou o tempo de exposição do desinfetante visando corrigir situações específicas que comumente ocorrem numa planta industrial.

A taxa de morte na presença do calor constante é uma função exponencial. Conseqüentemente, quando o \log_{10} dos números dos sobreviventes são traçados em relação ao tempo, o comportamento é descrito por uma linha reta. O valor de D é

definido amplamente como o tempo exigido para o número de bactérias viáveis para diminuir 1 unidade logarítmica (ou o negativo recíproco desta inclinação).

Este valor de D é usado então como um modelo para respostas além dos dados visando estimar o tempo exigido para a desinfecção (10^{-3} CFU/ml) ou a esterilização (10^{-6} CFU/ml) considerando-se as cinéticas de morte como de primeira ordem (STUMBO, 1948a,b; ABRAHAM et al., 1990). Além disso, os valores de D são sugeridos como indicadores rápidos da eficácia preservativa de um produto (ORTH, 1979; AKERS, 1984).

Existem três métodos para a determinação do valor de D da informação cinética de morte microbiana (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1985). O mais simples é o método de Stumbo ou de valor-limite que utiliza somente pontos iniciais e terminais do tempo. Neste método, uma quantidade conhecida de bactérias é exposta às condições de desinfecção para uma quantidade de tempo específico, e o número de sobreviventes é determinado. O valor de D é definido como a relação do tempo ao \log_{10} da redução em UFC por mililitro. O segundo método envolve calcular a média dos valores múltiplos do valor-limite D, um para cada amostragem, derivado no curso de uma experiência. O terceiro, utiliza a análise de regressão linear de pontos de dados múltiplos.

Todos os três destes métodos fornecerão valores similares para a taxa de morte quando as cinéticas são de primeira ordem. Se o relacionamento entre o \log_{10} do número de sobreviventes e o tempo não é linear, entretanto, resultarão em medidas muito diferentes. Estas diferenças terão um efeito direto na eficácia de um produto no mercado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Avaliação da eficiência de quatro princípios ativos utilizados nas indústrias de alimentos

Nesta etapa foram testadas diferentes concentrações de sanitizantes, com diferentes temperaturas de preparo da solução e diferentes tempos de contato.

Foram utilizados quatro princípios ativos, sendo três largamente utilizados no mercado atual, a clorexidina, o quaternário de amônia e o ácido peracético e um com utilização mais recente que é um *blend* de ácidos orgânicos.

Os sanitizantes possuem formulações com diferentes concentrações de princípios ativos, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração de princípio ativo dos sanitizantes comerciais avaliados.

Sanitizantes	Princípio ativo (%)
Ácido Peracético	15
Clorexidina	20
Quaternário de Amônio	20
Ácidos orgânicos	Ácido ascórbico - 1
	Ácido cítrico - 0,475
	Ácido láctico - 0,475

Foram avaliadas quatro diluições e três tempos de contato dos diferentes sanitizantes, sendo que as concentrações indicadas pelos fornecedores são as concentrações dois e três, e o tempo mínimo de contato recomendado é o tempo dois (Tabela 2).

As temperaturas testadas foram de 10 e 45°C, sendo estas temperaturas escolhidas por apresentarem uma diferença significativa entre elas, sendo duas temperaturas facilmente encontradas em águas utilizadas nas indústrias.

As temperaturas referem-se à temperatura de preparo da solução, ou seja, esta temperatura é atingida no momento da diluição do sanitizante não sendo mantida constante posteriormente.

Tabela 2 - Concentrações (% do produto comercial) e tempos de contato (minutos) dos diferentes sanitizantes avaliados.

	Ácido Peracético	Clorexidina	Quaternário de Amônio	Ácidos orgânicos
Concentração 1 (%)	0,2	0,2	0,2	0,2
Concentração 2 (%)	0,5	0,5	0,6	0,6
Concentração 3 (%)	0,8	0,8	1	1
Concentração 4 (%)	1,1	1,1	1,4	1,4
Tempo de contato 1 (Min)	2	2	2	2
Tempo de contato 2 (Min)	10	10	10	15
Tempo de contato 3 (Min)	18	18	18	25

Para a avaliação da eficiência microbiológica dos sanitizantes utilizou-se a técnica descrita na Portaria 101 de 11/08/1993 – Anexo Parte IV – Determinações Analíticas - Ministério da Agricultura e do Abastecimento – MAPA, Brasil.

As soluções foram testadas quanto a sua eficácia frente a quatro microrganismos, sendo eles a *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*.

Os microrganismos teste foram inoculados em tubos com caldo infusão cérebro coração (BHI - infusão de cérebro de bezerro 200 g L⁻¹, infusão de coração de boi 250 g L⁻¹, proteose peptona 10 g L⁻¹, dextrose 2 g L⁻¹, cloreto de sódio 5 g L⁻¹, fosfato dissódico 2,5 g L⁻¹) e incubados por 24 horas a 35°C.

Após incubação foram feitas diluições sucessivas de cada cultura (10⁻¹ a 10⁻⁸) em água peptonada (0,1%), plaqueamento em agar padrão de contagem (PCA - triptona 5,0 g L⁻¹, extrato de levedura 2,5 g L⁻¹, dextrose 1,0 g L⁻¹, agar 15,0 g L⁻¹), incubação por 24 horas a 35°C e posterior contagem.

Os sanitizantes foram diluídos assepticamente em 9 mL de água destilada. Imediatamente antes do início dos testes de eficiência, foi adicionado a cada tubo com 9 mL do desinfetante diluído, 1mL de leite UHT (fonte de matéria orgânica).

A cada diluição dos diferentes sanitizantes foi adicionado 0,1mL da cultura teste em fase estacionária na diluição 10⁻² UFC mL⁻¹ e homogeneizado.

Após os diferentes tempos de exposição (Tabela 2), foi transferida uma alçada para tubos contendo caldo BHI e estes incubados a 35°C por 96 horas.

A verificação de crescimento foi feita visualmente pela turvação e formação de película na superfície ou de precipitado no fundo dos tubos.

Os tubos positivos foram confirmados pelo repique e incubação em Agar Padrão de Contagem, considerando-se como ineficiente a concentração ou tempo de exposição com crescimento confirmado no PCA.

3.2 Testes em planta industrial: Avaliação da eficiência dos quatro sanitizantes

Em uma segunda etapa foram realizados testes em uma planta industrial onde se aplicaram as concentrações, temperaturas e tempo de contato com os melhores resultados da primeira etapa, utilizando-se para isso a técnica de swabs, medindo-se a contagem total de mesófilos na superfície antes da aplicação do sanitizante e posterior à aplicação do mesmo.

Para estes testes escolheu-se a sala de cortes de uma unidade de abate de suínos e industrialização de produtos cárneos por ser um ponto central do processo, por onde irá passar a maior parte da matéria-prima utilizada nos processos de industrialização.

Foram realizados testes antes da aplicação do sanitizante, ou seja, após a higienização das mesas, e após a aplicação dos sanitizantes. Os testes foram realizados em duplicata em dois dias distintos. As condições testadas de cada sanitizante encontram-se na Tabela 3, sendo as melhores combinações de concentração, tempo de contato e temperatura de exposição, determinadas na avaliação qualitativa dos desinfetantes.

Para a avaliação dos sanitizantes na planta industrial foram realizadas análises de swab em dois pontos da superfície das mesas da sala de cortes, superfície onde são realizados a desossa e preparo dos cortes para venda ou industrialização, em uma planta de abate e processamento de carne suína. Foram utilizados swabs da marca 3M e placas delimitadoras com superfícies de contato de 20 cm².

Tabela 3 - Combinação de concentração, tempo de contato e temperatura para utilização eficiente dos diferentes sanitizantes.

Princípio ativo	Concentração (%)	Tempo de contato (min)	Temperatura (°C)
Ácido Peracético	0,2	2	10
Clorexidina	0,5	10	45
Quaternário de Amônio	0,6	2	10
Ácidos Orgânicos	1	15	10

As áreas de contato foram esfregadas 10 vezes no sentido ascendente, exercendo-se uma pressão firme na superfície de contato, sendo as placas delimitadoras esterilizadas com álcool e fogo, após cada coleta de amostra. As amostras foram coletadas em dois pontos distintos da mesa.

Em seguida, os microrganismos aderidos ao swab foram transferidos para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução de água peptonada 0,1% (p/v) esterilizada a 121°C por 15 minutos. O tubo foi agitado no vortex por alguns segundos, para liberar as bactérias do swab, após isso o conteúdo do tubo foi derramado cuidadosamente em uma placa estéril e adicionado cerca de 15ml de PCA previamente preparado e mantido em torno de 47°C, então foi homogeneizado e deixado solidificar em superfície plana.

A contagem total de aeróbios mesófilos baseia-se na semeadura da amostra ou de suas diluições em PCA, seguida de incubação em temperatura de $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

Após a completa solidificação, as placas foram incubadas a 36°C por 48 horas. Finalizado o período de incubação as colônias foram contadas e anotados os resultados.

3.3 Cinética de inativação de *Listeria monocytogenes* em suspensão, usando clorexidina como agente ativo

Na terceira etapa do trabalho foram avaliadas as curvas cinéticas de letalidade de *Listeria monocytogenes* em diferentes tempos e concentrações de clorexidina, determinando os respectivos valores D, permitindo calcular o valor Z e os diferentes valores F.

A linhagem de *L. monocytogenes* (ATCC 7644) mantida em meio Luria Bentani (triptona 10,0 g L⁻¹, extrato de levedura 5,0 g L⁻¹, NaCl 5,0 g L⁻¹) a 4°C foi subcultivada para preparação do inóculo em caldo padrão de contagem (triptona 5,0 g L⁻¹, extrato de levedura 2,5 g L⁻¹, e dextrose 1,0 g L⁻¹) a 35°C por 24 horas.

A partir deste inóculo foram preparadas diluições em água destilada (10⁰ a 10⁻⁸) e em cada réplica de diluição foi adicionada uma diferente concentração do desinfetante clorexidina (2,0 mL L⁻¹, 1,0 mL L⁻¹ e 0,5 mL L⁻¹) mantidos a 25°C.

Estas diluições foram inoculadas em meio agar padrão de contagem (agar 10g L⁻¹, triptona 5g L⁻¹, extrato de levedura 2,5 g L⁻¹, e dextrose 1,0 g L⁻¹) após diferentes tempos de exposição ao desinfetante (0, 0,5, 1, 1,5, 2, 3 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12,5, 15 18 e 20 minutos) e incubados a 35°C por 24 horas.

Diluições sem o desinfetante também foram inoculadas em Agar padrão de contagem e incubadas a 35°C por 24 horas para determinar o número inicial de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

As contagens foram realizadas nas placas oriundas das diluições com um número inferior a 350 colônias em cada um dos tempos de exposição ao desinfetante. Todas as determinações foram feitas em duplicata e os resultados expressos como valor médio.

O modelo matemático para determinar o tempo de redução decimal (valor-D) de *L.monocytogenes* em uma determinada concentração do desinfetante foi baseado em um balanço diferencial de primeira ordem (baseado em similaridades com processos de tratamento térmico);

$$\frac{dN}{dt} = -kN \quad (1)$$

onde N é o número de UCF, t é tempo de processo, k é a constante de proporcionalidade.

Integrando-se a Equação (1) com a seguinte condição inicial $N(t=0) = N_0$, onde N_0 é o número de UCF inicial, tem-se;

$$\ln N - \ln N_0 = -kt \quad (2)$$

Rearranjando a Equação (2) em termos de log tem-se;

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{1}{D}t \quad (3)$$

onde, $k = 1/D$ e D definido como a constante de redução decimal, a qual representa o tempo necessário para haver a ocorrência de 1 (um) ciclo log no processo.

Para a obtenção do valor D , foi realizada a regressão linear entre os diferentes tempos de exposição do microrganismo ao desinfetante e o log de UFC sobreviventes, sendo D o inverso do coeficiente angular da reta ajustada.

A constante de resistência de morte de *L. monocytogenes* ao desinfetante (valor- Z) foi determinada pela seguinte equação:

$$\log\left(\frac{D_1}{D_2}\right) = \frac{1}{Z}(C_1 - C_2) \quad (4)$$

Onde D_1 e D_2 são valores de redução decimal obtidos para as concentrações C_1 e C_2 , respectivamente. A constante Z representa a alteração de concentração necessária para que ocorra uma alteração de um ciclo log (90% de redução) no tempo de morte ocasionado pelo desinfetante.

Para a obtenção do valor Z , foi realizada a regressão linear entre as diferentes concentrações do desinfetante (C) e o log do respectivo valor D , sendo Z obtido a partir do inverso do coeficiente angular da reta ajustada.

É interessante salientar que a Equação (3) é de fundamental importância e utilidade em projetos, simulações e aplicações industriais do produto em foco neste trabalho. A partir do conhecimento da constante Z e dos valores de D_1 em uma concentração C_1 pode-se determinar o valor da concentração de aplicação do produto.

3.4 Análise de custos dos diferentes sanitizantes

Em uma última etapa foi realizada uma simulação de análise de custos com diferentes combinações de uso dos sanitizantes nas concentrações e tempos de exposição determinadas como eficientes.

No mundo atual todos os custos presentes em um processo de produção devem ser analisados e na medida do possível minimizados. Os resultados sempre devem ser medidos utilizando o binômio custo/qualidade, sendo assim não pode-se deixar de analisar este aspecto no momento de decidir qual o melhor sanitizante a ser utilizando no processo de higiene da planta de processamento, procurar um produto que garanta a qualidade dos produtos, mas que não onere o custo dos mesmos.

Nesta etapa do trabalho foram analisados os custos de se utilizar diferentes programas de higienização considerando os resultados atingidos nas etapas anteriores do estudo.

Foram simulados custos para diferentes finalidades e considerando sempre que o consumo geral da planta em questão é de 1600 litros de solução de sanitizante por dia, sendo este dado conseguido junto a uma empresa que abate e esposteja uma média de 1800 suínos/dia e ainda tem uma planta de processamento de industrializados, linha de presuntos de 80 toneladas/dia.

Considerou-se ainda que a empresa trabalha de segunda a sábado, ou seja, com seis higienizações gerais durante uma semana.

Para as simulações, tomaram-se como base os melhores resultados do testes anteriores para os quatro microrganismos estudados e foram feitas 5 simulações: a primeira sem um rodízio entre os sanitizantes, no segundo caso com rodízio entre os sanitizantes, no terceiro caso sem a utilização do ácido peracético, no quarto caso criou-se uma simulação para controle de *E. coli*, utilizando a clorexidina e o ácido peracético e no último caso uma alternativa para controle de *Listeria* utilizando-se o ácido peracético e o *blend* de ácidos orgânicos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da eficiência de quatro princípios ativos utilizados nas indústrias de alimentos

4.1.1 Avaliação qualitativa da eficiência do ácido peracético

A Tabela 4 apresenta os resultados para a eficiência do ácido peracético com temperatura de 10°C.

Tabela 4 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição do ácido peracético a 10°C sobre as bactérias testadas.

Concentração (%)	Tempo (min)	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
0,2	2	+	+	+	+
0,2	10	+	+	+	+
0,2	18	+	+	+	+
0,5	2	+	+	+	+
0,5	10	+	+	+	+
0,5	18	+	+	+	+

+ Eficiente

Observa-se que o ácido peracético foi eficiente em 10°C para todas as concentrações e todos os tempos de contato utilizados. Por esse motivo não foram realizados os experimentos com concentrações mais altas.

Um estudo realizado por Briñez et al. (2006) avaliou o efeito bactericida de ácido peracético contra estirpes patogênicas e não patogênicas de *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. e *Escherichia coli*, os autores verificaram que o mesmo foi efetivo (redução maior que 5 log UFC mL⁻¹) em concentrações de 0,1 % e 10 minutos de exposição em todos os casos.

Analisando os resultados expressos na Tabela 4 e comparando com a Tabela 5 observa-se que o ácido peracético demonstra perda de eficiência quando a temperatura é elevada de 10°C para 45°C, pois com a temperatura da solução em 45°C, o ácido peracético não foi eficiente para *Salmonella choleraesuis* nas concentrações de 0,2%, 0,5% e 0,8% no tempo de 2 minutos. Também observa-se a não eficiência para *Listeria* sp. na concentração de 0,2% nos tempos de 2 e 10 minutos.

Tabela 5 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição do ácido peracético a 45°C sobre as bactérias testadas.

Concentração (%)	Tempo (min)	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
0,2	2	-	+	+	-
0,2	10	+	+	+	-
0,2	18	+	+	+	+
0,5	2	-	+	+	+
0,5	10	+	+	+	+
0,5	18	+	+	+	+
0,8	2	-	+	+	+
0,8	10	+	+	+	+
0,8	18	+	+	+	+
1,1	2	+	+	+	+
1,1	10	+	+	+	+
1,1	18	+	+	+	+

+ Eficiente; - Não eficiente.

Segundo Kunigk et al. (2001) uma maior eficácia do ácido peracético é demonstrada a 25°C, enquanto o aumento da temperatura para 45°C provoca rápida decomposição do produto.

A Figura 1 demonstra a perda de eficiência com o aumento da temperatura relacionando o percentual de testes que foram eficientes nas duas temperaturas.

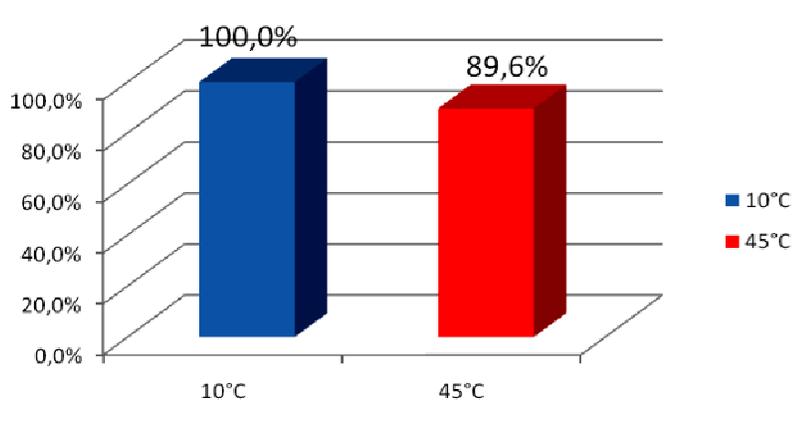


Figura 1 - Percentual de eficiência comparativa de diferentes concentrações e tempos de exposição do ácido peracético a 10°C e 45°C.

4.1.2 Avaliação qualitativa da eficiência da clorexidina

Analisando a Tabela 6 é possível observar que a clorexidina a 10°C necessita de uma concentração de 0,5% e um tempo de 18 minutos ou uma concentração de 0,8% e um tempo de 10 minutos para ser eficiente contra as bactérias analisadas.

Tabela 6 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição de clorexidina a 10°C sobre as bactérias testadas.

Concentração (%)	Tempo (min)	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
0,2	2	-	-	+	-
0,2	10	-	-	+	-
0,2	18	-	+	+	+
0,5	2	-	-	+	+
0,5	10	-	+	+	+
0,5	18	+	+	+	+
0,8	2	-	-	+	+
0,8	10	+	+	+	+
0,8	18	+	+	+	+
1,1	2	+	+	+	+
1,1	10	+	+	+	+
1,1	18	+	+	+	+

+ Eficiente; - Não eficiente.

Observa-se um incremento de eficiência da clorexidina quando a temperatura é elevada de 10°C para 45°C, pois com a solução em 45°C (Tabela 7) a clorexidina já é eficiente com concentração de 0,2% em 18 minutos o que não aconteceu a 10°C. Também a 0,5% e tempo de 10 minutos a clorexidina a 45°C é eficiente contra a *Salmonella choleraesuis*, o que não ocorre a 10°C.

Tabela 7 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição de clorexidina a 45°C sobre as bactérias testadas.

Concentração (%)	Tempo (min)	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
0,2	2	-	-	+	-
0,2	10	-	+	+	+
0,2	18	+	+	+	+
0,5	2	-	-	+	+
0,5	10	+	+	+	+
0,5	18	+	+	+	+
0,8	2	+	-	+	+
0,8	10	+	+	+	+
0,8	18	+	+	+	+
1,1	2	+	+	+	+
1,1	10	+	+	+	+
1,1	18	+	+	+	+

+ Eficiente; - Não eficiente

A Figura 2 demonstra a melhora de eficiência da clorexidina com o aumento da temperatura de 10°C para 45°C, relacionando o percentual de testes que foram eficientes nas duas temperaturas.

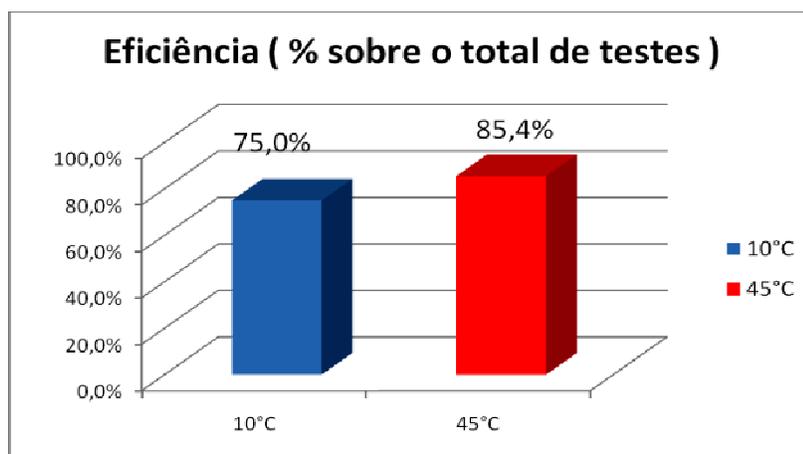


Figura 2 - Percentual de eficiência comparativa de diferentes concentrações e tempos de exposição da clorexidina a 10°C e 45°C.

Bambace et al. (2003) demonstraram a eficiência da clorexidina com concentração 0,5% para o controle de superfícies, frente ao *S. aureus*.

A clorexidina demonstrou-se eficaz nas concentrações indicadas pelo fornecedor, sendo uma boa alternativa para o uso em no controle dos microrganismos testados.

4.1.3. Avaliação qualitativa da eficiência de quaternário de amônia

Os resultados da avaliação (Tabela 8) demonstram que o quaternário de amônia se mostrou eficiente para todas as bactérias na concentração de 0,2% em 18 minutos ou com concentrações superiores já em 2 minutos.

Tabela 8 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição de quaternário de amônia a 10°C sobre as bactérias testadas.

Concentração (%)	Tempo (min)	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
0,2	2	-	-	-	-
0,2	10	-	-	-	+
0,2	18	+	+	+	+
0,6	2	+	+	+	+
0,6	10	+	+	+	+
0,6	18	+	+	+	+
1	2	+	+	+	+
1	10	+	+	+	+
1	18	+	+	+	+
1,4	2	+	+	+	+
1,4	10	+	+	+	+
1,4	18	+	+	+	+

+ Eficiente; - Não eficiente.

A utilização de quaternário de amônia a 45°C (Tabela 9) provoca uma pequena redução de sua eficiência quando comparado a 10°C, pois deixa de ser eficiente para a *Salmonella choleraesuis* com concentração de 0,2% em 18 minutos, sendo que a 10°C se mostra eficiente neste tempo e nesta concentração.

Tabela 9 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição de quaternário de amônia a 45°C sobre as bactérias testadas.

Concentração (%)	Tempo (min)	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
0,2	2	-	-	-	-
0,2	10	-	-	-	+
0,2	18	-	+	+	+
0,6	2	+	+	+	+
0,6	10	+	+	+	+
0,6	18	+	+	+	+
1	2	+	+	+	+
1	10	+	+	+	+
1	18	+	+	+	+
1,4	2	+	+	+	+
1,4	10	+	+	+	+
1,4	18	+	+	+	+

+ Eficiente; - Não eficiente.

Entretanto esta influência de redução de eficiência com o aumento de temperatura é baixa, como pode ser observado na Figura 3.

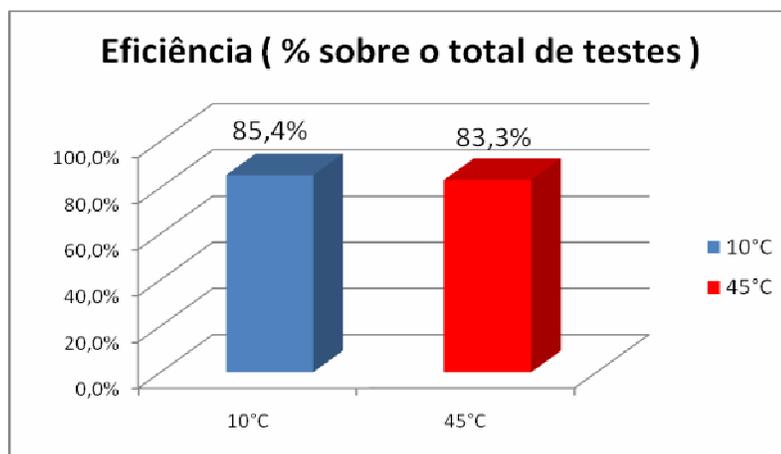


Figura 3 - Percentual de eficiência comparativa de diferentes concentrações e tempos de exposição de quaternário de amônia a 10°C e 45°C.

Santos & Moura (2007) atestam que o quaternário de amônio testado a 0,26% mostrou-se eficiente no controle de *E. coli* e de *S. aureus* em um tempo de 20 minutos.

4.1.4. Avaliação qualitativa da eficiência de ácidos orgânicos

Analisando a Tabela 10 observa-se a baixa eficiência dos ácidos orgânicos frente às bactérias analisadas, não sendo eficiente frente a *E. coli* e ao *Staphylococcus aureus* em nenhuma concentração e tempo. Somente mostrou-se eficiente frente à *Salmonella choleraesuis* com concentração de 0,6% em 25 minutos ou com concentração superior 1% em tempo de 15 minutos. Seu melhor desempenho se deu frente à *Listeria* sp. onde foi eficiente em concentração de 0,2% após 15 minutos.

Tabela 10 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição de ácidos orgânicos a 10°C sobre as bactérias testadas.

Concentração (%)	Tempo (min)	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
0,2	2	-	-	-	-
0,2	15	-	-	-	+
0,2	25	-	-	-	+
0,6	2	-	-	-	-
0,6	15	+	-	-	+
0,6	25	+	-	-	+
1	2	-	-	-	-
1	15	+	-	-	+
1	25	+	-	-	+
1,4	2	-	-	-	-
1,4	15	+	-	-	+
1,4	25	+	-	-	+

+ Eficiente; - Não eficiente.

Tabela 11 - Avaliação da eficiência de diferentes concentrações e tempos de exposição de ácidos orgânicos a 45°C sobre as bactérias testadas.

Concentração (%)	Tempo (min)	<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>L. monocytogenes</i>
0,2	2	-	-	-	-
0,2	15	-	-	-	-
0,2	25	-	-	-	-
0,6	2	-	-	-	-
0,6	15	-	-	-	-
0,6	25	+	-	-	+
1	2	-	-	-	-
1	15	-	-	-	-
1	25	+	-	-	+
1,4	2	-	-	-	-
1,4	15	-	-	-	-
1,4	25	+	-	-	+

+ Eficiente; - Não eficiente.

Analisando a Tabela 11 e comparando com os resultados da Tabela 10 observa-se que a elevação da temperatura da solução de ácidos orgânicos de 10°C para 45°C, reduz a eficiência dos mesmos. Pode-se ver como exemplo o caso da eficiência contra a *Listeria* sp. que era relativamente boa, pois em 15 minutos foi eficiente em todas as concentrações testadas, já a 45°C demonstra somente eficiência em 0,6% de concentração.

Estes resultados tornam-se mais evidentes analisando-se a Figura 4, que apresenta a queda de eficiência percentual com o aumento da temperatura.

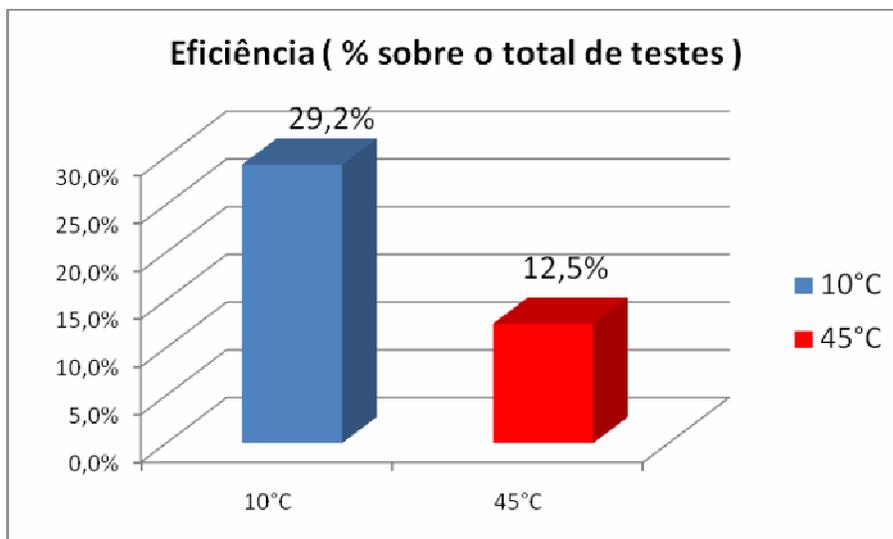


Figura 4 - Percentual de eficiência comparativa de diferentes concentrações e tempos de exposição de ácidos orgânicos a 10°C e 45°C.

A baixa eficiência dos ácidos orgânicos frente aos microrganismos testados pode ser devido aos mesmos não estarem na forma não dissociada no momento da aplicação do produto.

A atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos está relacionada à redução do pH e à capacidade de dissociação de suas carboxilas (CHERRINGTON et al., 1991). Na forma não dissociada, esses ácidos podem penetrar passivamente na célula microbiana, onde liberam prótons e ânions, o que resulta em redução do pH intracelular, inibindo a ação de enzimas e levando o microrganismo à morte. A ação antimicrobiana, entretanto, pode depender também do acúmulo de ânions no conteúdo intracelular (RUSSELL, 1992).

A ação inibidora dos ácidos orgânicos na forma não dissociada é de 100 a 600 vezes maior do que na forma dissociada. Os ácidos orgânicos não dissociados podem permear a membrana celular por difusão e liberar prótons no citoplasma da célula (EKLUND, 1983).

A Tabela 12 mostra os valores de pH para as diferentes soluções do sanitizantes testado.

Tabela 12 - Valores de pH para diferentes concentrações da solução de ácidos orgânicos.

Solução	pH
100%	1,17
10%	2,64
1%	4,53
0,10%	4,71

Observa-se na Tabela 12 que quanto mais diluído o *blend* de ácidos maior é seu pH e comparando os dados da Tabela 12 com os dados da Tabela 13 que mostra a relação entre o pH dos ácidos e a proporção de ácidos não dissociados, vemos que quanto maior o pH menor o percentual de ácido não dissociado, sabendo que os ácidos orgânicos são mais eficientes com antimicrobianos na forma não dissociada, portanto, quanto maior o pH (mais neutro) menos a eficiência dos mesmos.

A solução de ácidos orgânicos testada na concentração de 1%, com pH 4,53, deve estar apresentando um percentual baixo de ácidos não dissociados o que justificaria a sua baixa eficiência frente aos microrganismos testados.

Tabela 13 - Relação entre o pH e o percentual de ácidos na forma não dissociada.

Ácidos orgânicos	Valores de pH			
	3	4	5	6
Ácido láctico	86,6	39,2	6,05	0,64
Ácido cítrico	53	18,9	0,41	0,006

4.1.5. Avaliação qualitativa da eficiência dos sanitizantes sobre os diferentes microrganismos avaliados

Foi avaliada a eficiência dos sanitizantes sobre cada microrganismo, considerando-se a relação do número de testes eficientes sobre o número total de testes realizados.

Salmonella choleraesuis.

O melhor desempenho para a *Salmonella choleraesuis* foi alcançado com a utilização de ácido peracético a 10°C, pois foi eficiente mesmo em sua concentração mais baixa testada (Figura 5).

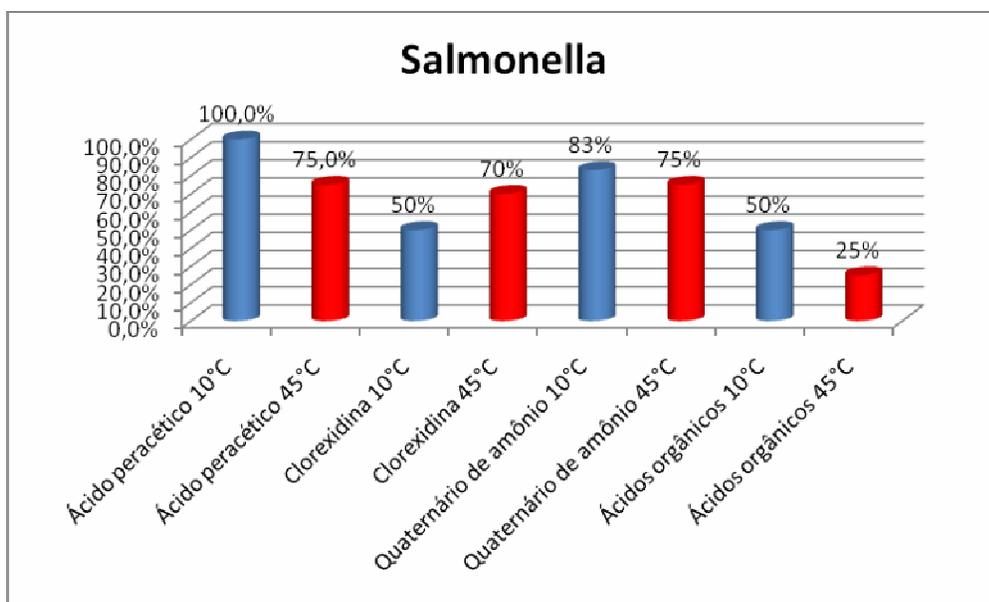


Figura 5 - Comparativo de eficiência dos diferentes sanitizantes sobre *Salmonella choleraesuis*.

A Tabela 14 mostra os resultados gerais para *Salmonella choleraesuis*, onde pode-se observar o bom desempenho da ácido peracético, mesmo em baixas concentrações, sendo o único que foi eficiente na menor concentração e nos dois tempos de contato menores.

Para o controle de *Salmonella choleraesuis* verificou-se que o ácido peracético tem o melhor desempenho, não devendo ser preparada sua solução em temperaturas próximas a 45°C, pois assim tem-se uma redução da sua eficiência. Como segunda opção tem-se o quaternário de amônio que apresenta resultados

semelhantes em ambas as temperaturas e também a opção da clorexidina a 45°C demonstra um bom desempenho.

A opção não recomendada seria os ácidos orgânicos que não possuem bom desempenho frente ao controle da *Salmonella choleraesuis*.

Os ácidos orgânicos apresentaram comportamento irregular em termos de atividade bactericida em rações artificialmente contaminadas por *Salmonella* spp (ALBUQUERQUE et al., 1988).

Tabela 13 - Eficiência dos sanitizantes sobre *Salmonella choleraesuis* em diferentes temperaturas, concentrações e tempos de contato.

TEMP	CONC	TC	AP	CX	QA	AO
1	1	1	+	-	-	-
1	1	2	+	-	-	-
1	1	3	+	-	+	-
1	2	1	+	-	+	-
1	2	2	+	-	+	-
1	2	3	+	+	+	+
1	3	1	NR	-	+	+
1	3	2	NR	+	+	+
1	3	3	NR	+	+	+
1	4	1	NR	+	+	-
1	4	2	NR	+	+	+
1	4	3	NR	+	+	+
2	1	1	-	-	-	-
2	1	2	+	-	-	-
2	1	3	+	+	-	-
2	2	1	-	-	+	-
2	2	2	+	+	+	+
2	2	3	+	+	+	+
2	3	1	-	+	+	-
2	3	2	+	+	+	-
2	3	3	+	+	+	+
2	4	1	+	+	+	-
2	4	2	+	+	+	-
2	4	3	+	+	+	+

Staphylococcus aureus

O ácido peracético a 10°C foi eficiente mesmo na concentração mais baixa conforme pode-se observar na Figura 6 e na Tabela 15.

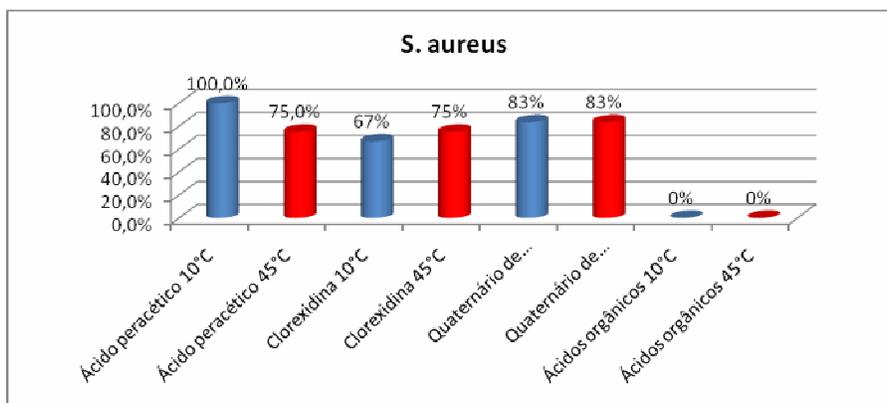


Figura 6 - Comparativo de eficiência dos diferentes sanitizantes sobre *Staphylococcus aureus*.

Como uma segunda opção para o controle de *S. aureus* observa-se que o quaternário de amônio mostra-se uma boa opção, sendo mais eficiente que a clorexidina. Já os ácidos orgânicos se mostraram totalmente ineficientes quanto ao controle de *S. aureus*.

Tabela 15 - Eficiência dos sanitizantes sobre *Staphylococcus aureus* em diferentes temperaturas, concentrações e tempos de contato.

TEMP	CONC	TC	AP	CX	QA	AO
1	1	1	+	-	-	-
1	1	2	+	-	-	-
1	1	3	+	+	+	-
1	2	1	+	-	+	-
1	2	2	+	+	+	-
1	2	3	+	+	+	-
1	3	1	NR	-	+	-
1	3	2	NR	+	+	-
1	3	3	NR	+	+	-
1	4	1	NR	+	+	-
1	4	2	NR	+	+	-
1	4	3	NR	+	+	-
2	1	1	-	-	-	-
2	1	2	+	+	-	-
2	1	3	+	+	+	-
2	2	1	-	-	+	-
2	2	2	+	+	+	-
2	2	3	+	+	+	-
2	3	1	-	-	+	-
2	3	2	+	+	+	-
2	3	3	+	+	+	-
2	4	1	+	+	+	-
2	4	2	+	+	+	-
2	4	3	+	+	+	-

Escherichia coli

Para o controle de *E. coli* observa-se que o ácido peracético e a clorexidina se mostram os mais eficientes (Figura 7), sem neste caso ocorrer à interferência da temperatura. O quaternário de amônio aparece como uma terceira opção sendo necessário para ser eficiente ou de uma concentração maior ou de um tempo de contato maior, conforme nos mostra a Tabela 16.

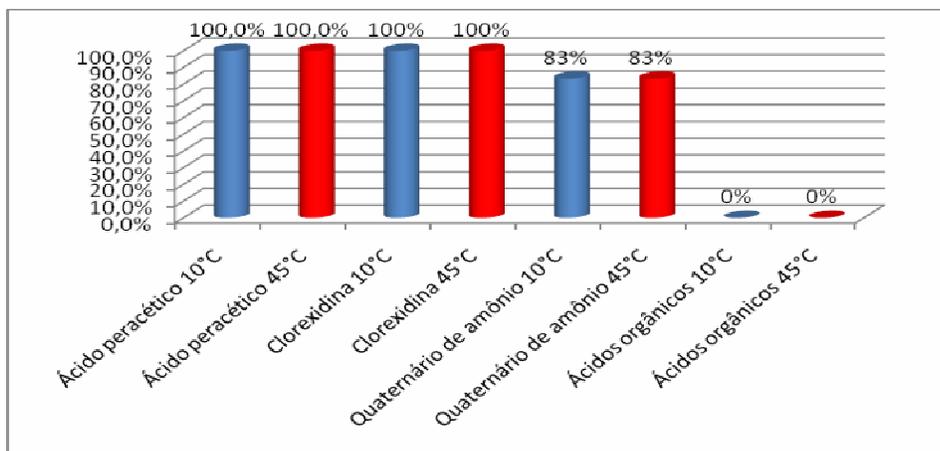


Figura 7 - Comparativo de eficiência dos diferentes sanitizantes sobre *Escherichia coli*.

Tabela 16 - Eficiência dos sanitizantes sobre *Escherichia coli* em diferentes temperaturas, concentrações e tempos de contato.

TEMP	CONC	TC	AP	CX	QA	AO
1	1	1	+	+	-	-
1	1	2	+	+	-	-
1	1	3	+	+	+	-
1	2	1	+	+	+	-
1	2	2	+	+	+	-
1	2	3	+	+	+	-
1	3	1	NR	+	+	-
1	3	2	NR	+	+	-
1	3	3	NR	+	+	-
1	4	1	NR	+	+	-
1	4	2	NR	+	+	-
1	4	3	NR	+	+	-
2	1	1	+	+	-	-
2	1	2	+	+	-	-
2	1	3	+	+	+	-
2	2	1	+	+	+	-
2	2	2	+	+	+	-
2	2	3	+	+	+	-
2	3	1	+	+	+	-
2	3	2	+	+	+	-
2	3	3	+	+	+	-
2	4	1	+	+	+	-
2	4	2	+	+	+	-
2	4	3	+	+	+	-

Listeria monocytogenes

O ácido peracético a 10°C demonstra ser o princípio ativo mais indicado para o controle de *Listeria monocytogenes*, podendo ser apontado com bons resultados também o quaternário de amônio em ambas as temperaturas e a clorexidina a 45°C (Figura 8). O ácido orgânico apresenta um bom resultado a 10°C, podendo-se notar na Tabela 17 que ele apresenta um bom desempenho no controle de *L. monocytogenes* quando o tempo de contato é igual ou superior a 15 minutos.

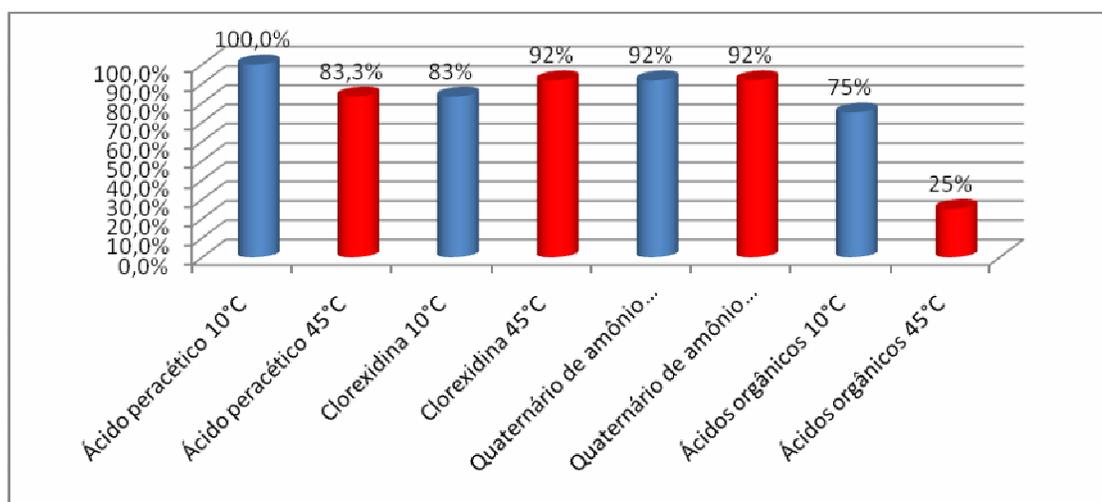


Figura 8 - Comparativo de eficiência dos diferentes sanitizantes sobre *Listeria monocytogenes*.

Tabela 17 - Eficiência dos sanitizantes sobre *Listeria monocytogenes* em diferentes temperaturas, concentrações e tempos de contato.

TEMP	CONC	TC	AP	CX	QA	AO
1	1	1	+	-	-	-
1	1	2	+	-	+	+
1	1	3	+	+	+	+
1	2	1	+	+	+	-
1	2	2	+	+	+	+
1	2	3	+	+	+	+
1	3	1	NR	+	+	-
1	3	2	NR	+	+	+
1	3	3	NR	+	+	+
1	4	1	NR	+	+	-
1	4	2	NR	+	+	+
1	4	3	NR	+	+	+
2	1	1	-	-	-	-
2	1	2	-	+	+	-
2	1	3	+	+	+	-
2	2	1	+	+	+	-
2	2	2	+	+	+	+
2	2	3	+	+	+	+
2	3	1	+	+	+	-
2	3	2	+	+	+	-
2	3	3	+	+	+	-
2	4	1	+	+	+	-
2	4	2	+	+	+	-
2	4	3	+	+	+	+

4.2 Testes em planta industrial: Avaliação da eficiência de quatro sanitizantes

4.2.1 Ácido Peracético

As análises realizadas antes e após a sanitização com ácido peracético demonstraram sua eficiência na concentração e tempo de exposição estabelecidas (0,2% e 2 minutos de exposição) em condições de uso comercial (Figura 9), pois mesmo partindo de uma alta contagem inicial (300 UFC/20cm²) atingiu resultados bem abaixo do padrão máximo esperado (5 e 2 UFC/20cm²), que é de 10 UFC/cm² ou 200 UFC/20cm², padrão este retirado da diretiva 471/ 2001 da Comissão Européia.

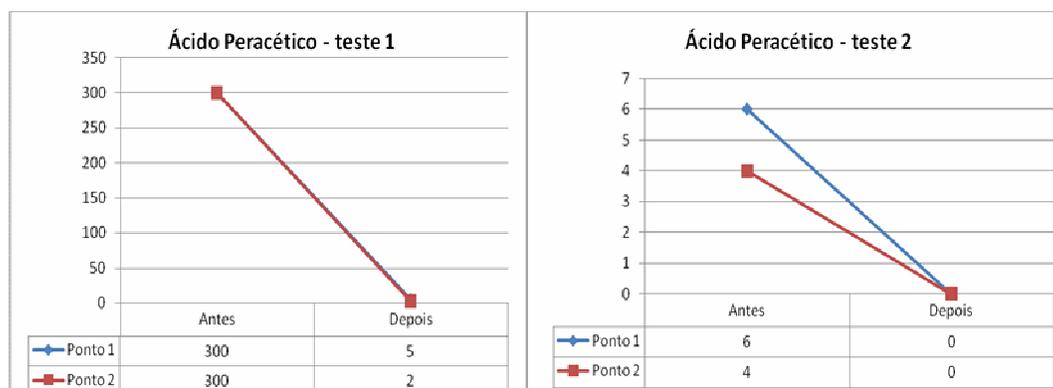


Figura 9 - Contagem total de microrganismos heterotróficos (UFC/20cm²) antes e depois da sanitização com ácido peracético

4.2.2 Clorexidina

A clorexidina obteve bons resultados na avaliação, pois embora a contagem inicial tenha sido baixa em todos os testes, em três dos quatro testes o resultado final foi zero (Figura 10), semelhante ao encontrado com ácido peracético quando em baixas contagens iniciais.

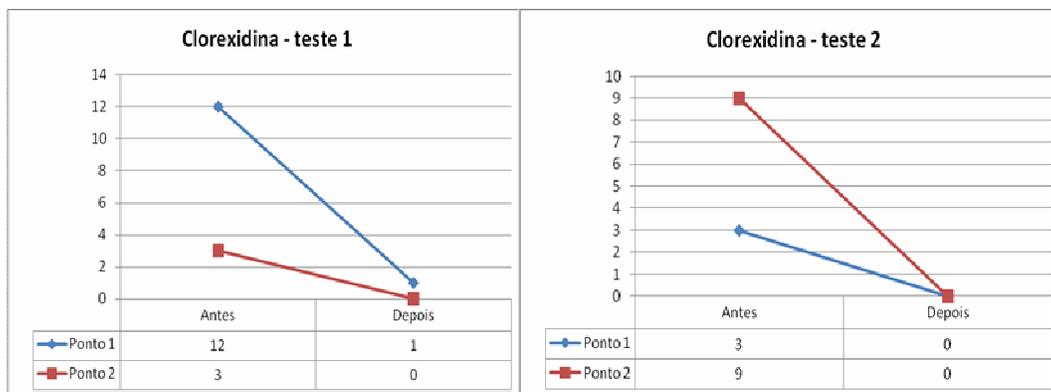


Figura 10 - Contagem total de microrganismos heterotróficos (UFC/20cm²) antes e depois da sanitização com clorexidina.

4.2.3 Quaternário de Amônio

Os testes na planta industrial com as concentrações e tempo de exposição estabelecidas de amônio quaternário (0,6% e 2 minutos) mostraram-se eficientes atendendo a legislação, embora no teste 1, quando a contagem inicial foi maior, a redução de microrganismos tenha sido um pouco inferior a observada com ácido peracético quando em contagens iniciais semelhantes.

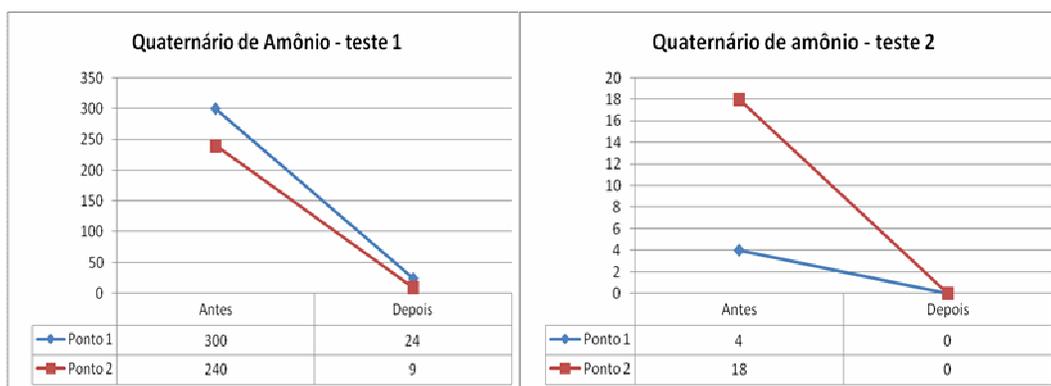


Figura 11 - Contagem total de microrganismos heterotróficos (UFC/20cm²) antes e depois da sanitização com quaternário de amônio.

4.2.4 Ácidos Orgânicos

As análises realizadas antes e após a sanitização com ácidos orgânicos demonstraram eficiência irregular dos mesmos na concentração e tempo de exposição estabelecidas (1% e 15 minutos de exposição) em condições de uso comercial (Figura 12), pois mesmo partindo de uma baixa contagem inicial (entre 1 e 11 UFC/20cm²) observou-se a manutenção e até mesmo um incremento de contagem após a sanitização, embora mantendo-se dentro dos padrões (200 UFC/20cm²). Estes resultados apontam os ácidos orgânicos como sanitizante de desempenho inferior aos demais testados.

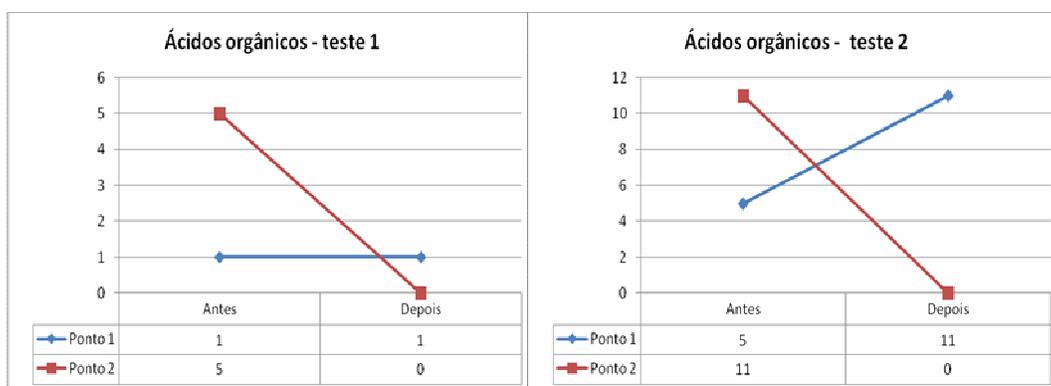


Figura 12 - Contagem total de microrganismos heterotróficos (UFC/20cm²) antes e depois da sanitização com ácidos.

4.3 Cinética de inativação de *Listeria monocytogenes* em suspensão, usando clorexidina como agente ativo

A regressão linear entre o Log de UFC de *L. monocytogenes* e o tempo em minutos com clorexidina a 0,2% (Figura 13), 0,1% (Figura 14) e 0,05% (Figura 15), permitiu determinar os valores D nestas concentrações obtendo-se 1,38, 3,087 e 4,81 minutos, respectivamente.

MAZZOLA et al. (2003) realizaram a determinação do tempo de redução decimal (valor-D) com clorexidina em diferentes bactérias. As cepas vegetativas que mostraram a maior resistência à solução de 0,4% clorexidina foram *Enterococcus cloacae* (D=8,3 min) e *Staphylococcus aureus* (D=5,9 min). As mais sensíveis foram *A. calcoaceticus* (D=4,1 min), *Serratia marcescens* (D=4,0 min) e *Escherichia coli* (D=3,0 min). Um intervalo de tempo de 3 a 4 minutos foi o bastante para reduzir 90% da população de *E. coli*, *S. marcescens* e *A. calcoaceticus*; uma redução de 3 log₁₀ para estas espécies variou entre 9 a 12 minutos. Esporos expostos a 2% de clorexidina mostraram valores D próximos entre si com D=9,1 min para *Bacillus stearothermophilus* e D=6,7 min para *Bacillus subtilis*.

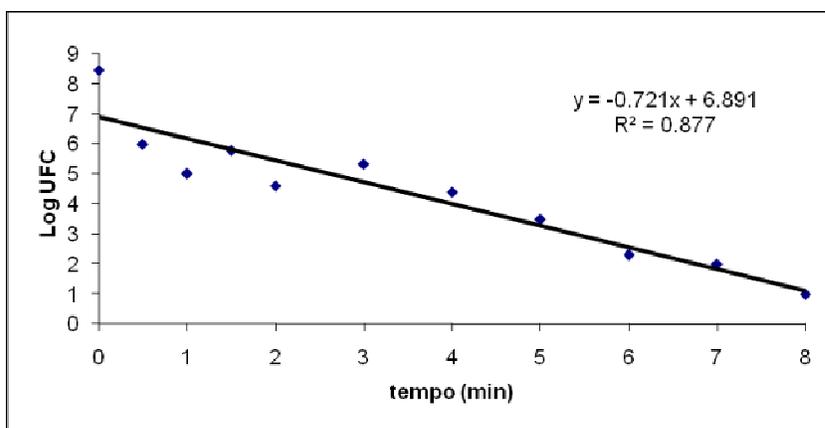


Figura 13 - Regressão linear entre o Log de UFC de *L. monocytogenes* e o tempo em minutos com clorexidina a 0,2%.

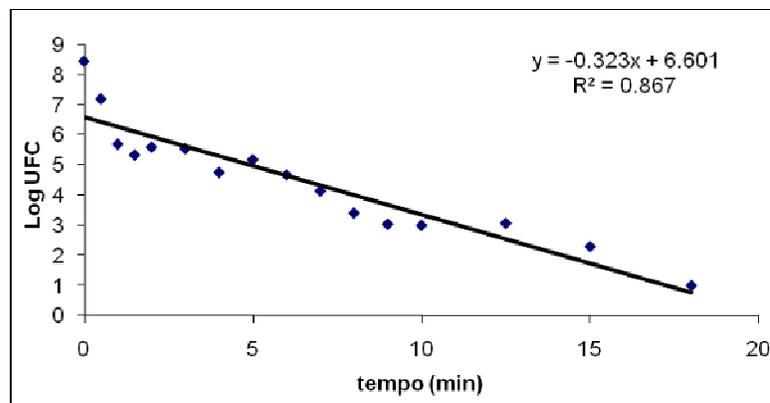


Figura 14 - Regressão linear entre o Log de UFC de *L. monocytogenes* e o tempo em minutos com clorexidina a 0,1%.

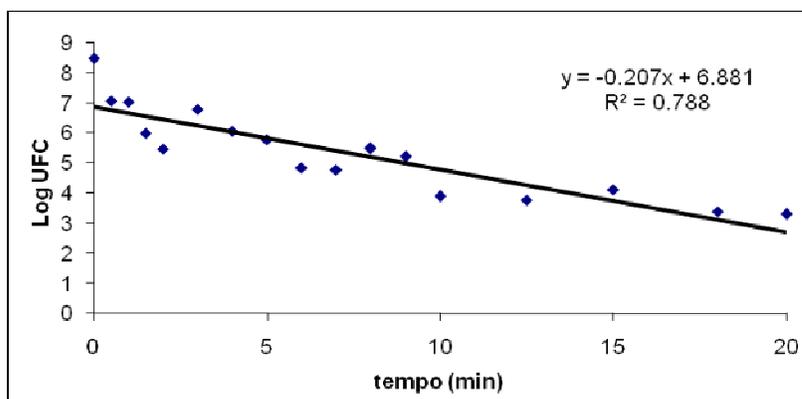


Figura 15 - Regressão linear entre o Log de UFC de *L. monocytogenes* e o tempo em minutos com clorexidina a 0,05%.

A regressão linear entre o Log dos valores D de *L. monocytogenes* em relação às concentrações de clorexidina testadas (Figura 16), mostrou alta linearidade entre os diferentes valores D obtidos e forneceu um valor Z de -0,2788.

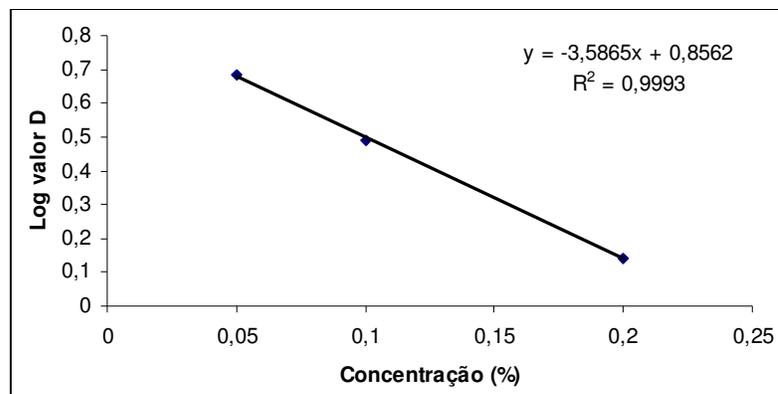


Figura 16 - Regressão linear entre o Log dos valores D de *L. monocytogenes* em relação às concentrações de clorexidina testadas.

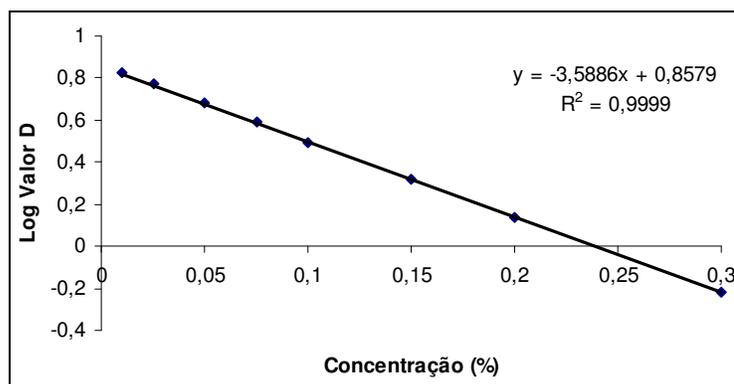


Figura 17 - Regressão linear entre o Log dos valores D de *L. monocytogenes* em relação às concentrações de clorexidina testadas e calculadas a partir do valor Z.

Embora alguns autores tenham reportado um comportamento não linear da taxa de morte de determinados microrganismos frente a diferentes desinfetantes (CAMPBELL & DIMMICK, 1966; TURNERS, 1983; SUTTON et al., 1991), os resultados do presente estudo indicam um comportamento linear do tempo de redução decimal de *L. monocytogenes* frente à clorexidina.

Usando-se o valor Z calculado, foi possível determinar diferentes valores de D em diferentes concentrações de uso. Plotando-se os valores de D calculados e valores de D experimentais (Figura 17), observa-se uma alta correlação linear ($R^2 = 0,9999$) e um valor calculado de -0,27866, semelhante ao valor Z determinado pela regressão entre os valores D e concentrações experimentais (-0,27882).

Considerando a aplicação destes resultados em uma planta industrial com diferentes níveis de contaminação inicial e uma contagem de 10^{-3} CFU/cm² para uma desinfecção eficiente (STUMBO, 1948a,b; ABRAHAM et al., 1990) pode-se calcular o tempo necessário de contato do sanitizante.

Assim, com contagens hipotéticas iniciais de 1000, 100 e 10 UFC/cm² resultam em tempos exigidos de contato de 8,28, 6,9 e 5,52 minutos de clorexidina a 0,2% (valor D=1,38 min). Já utilizando-se a concentração de 0,05% (valor D=4,81 min) e as mesmas contagens hipotéticas, os tempos necessários de contato são 28,86; 24,05 e 19,24 minutos, respectivamente. Nas mesmas condições, com uma concentração de 0,1% de clorexidina (valor D=3,087 min), tempos intermediários são necessários (18,52; 15,43 e 12,35 minutos).

Estes resultados são de grande utilidade na tomada de decisão quanto ao procedimento de higienização de uma planta industrial, pois permite a escolha da melhor relação concentração de produto/tempo de exposição, visando a redução de custos sem perda de eficiência do sanitizante.

4.4 Análise de custos

4.4.1 Simulação 1

Primeiramente utilizou-se somente o ácido peracético, que na temperatura de 10°C foi eficiente para todas as bactérias estudadas em 2 minutos na concentração de 0,2%.

Tabela 18 – Análise de custo semanal utilizando ácido peracético a 10°C por 2 minutos na concentração de 0,2%.

Sanitizantes	R\$/litro	Concentração	Dias utilizados
Ácido Peracético	8,50	0,20%	6
Custo Semanal (em reais)	102,00		

4.4.2 Simulação 2

Para esta simulação foi introduzido um produto a mais que a simulação 1 sendo utilizado o ácido peracético de segunda a sexta com concentração de 0,2% e no sábado o quaternário de amônio com concentração de 0,6%.

Tabela 19 - Análise de custo semanal utilizando ácido peracético na concentração de 0,2% e quaternário de amônio com concentração de 0,6%.

Sanitizantes	R\$/litro	Concentração	Dias utilizados
Ácido Peracético	8,50	0,20%	5
Quaternário de Amônio	6,82	0,60%	1
Custo Semanal (em reais)	125,92		

4.4.3 Simulação 3

Nesta simulação utilizou-se de segunda a sexta o quaternário de amônio a 0,6% e no sábado a clorexidina a 0,5%, com a não utilização do ácido peracético, visando um rodízio dos sanitizantes.

Tabela 20 - Análise de custo semanal utilizando clorexidina na concentração de 0,5% e quaternário de amônio com concentração de 0,6%.

Sanitizantes	R\$/litro	Concentração	Dias utilizados
Clorexidina	25,00	0,50%	1
Quaternário de Amônio	6,82	0,60%	5
Custo Semanal (em reais)	329,60		

As simulações acima seriam as mais indicadas para controle de *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e *Listéria monocytogenes*.

Para controle de *Escherichia coli* pode-se utilizar a simulação 1 ou com um rodízio utilizando para isso clorexidina.

4.4.4 Simulação 4

Nesta simulação utilizou-se o ácido peracético com concentração de 0,2% e a clorexidina com concentração de 0,5%, sendo uma alternativa à simulação 1, para o controle de *E. coli*.

Tabela 21 - Análise de custo semanal utilizando ácido peracético na concentração de 0,2% e clorexidina com concentração de 0,5%.

Sanitizantes	R\$/litro	Concentração	Dias utilizados
Ácido Peracético	8,50	0,20%	5
Clorexidina	25,00	0,50%	1
Custo Semanal (em reais)	210,00		

4.4.5 Simulação 5

Para o controle de *Listeria* sp. a simulação 1 seria a mais indicada, porém como uma boa alternativa podemos criar um rodízio utilizando o ácido peracético e a mistura de ácidos orgânicos.

Para esta simulação utilizou-se o ácido peracético a 0,2% de segunda a sexta e os ácidos orgânicos a 0,6% no sábado, onde os ácidos orgânicos podem ter maior eficiência devido ao tempo de contato disponível ser maior.

Tabela 22 - Análise de custo semanal utilizando ácido peracético na concentração de 0,2% e ácidos orgânicos com concentração de 0,6%.

Sanitizantes	R\$/litro	Concentração	Dias utilizados
Ácido Peracético	8,50	0,20%	5
Ácidos orgânicos	19,80	0,60%	1
Custo Semanal (em reais)	203,80		

Avaliando-se as simulações acima é possível observar que a utilização do ácido peracético durante 6 dias na semana é a alternativa com menor custo (Figura 18).

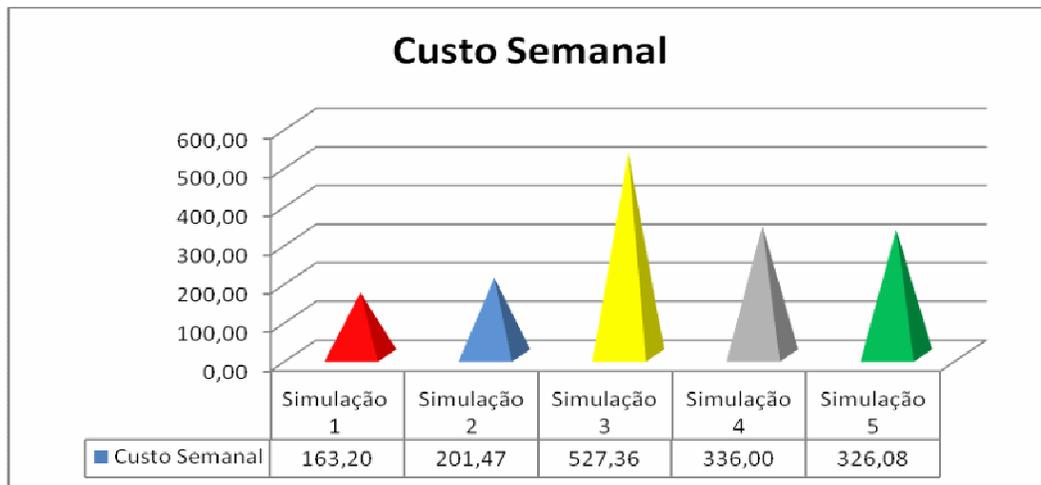


Figura 18 - Custo semanal do uso de diferentes combinações de sanitizantes.

A simulação 3 sem o uso do ácido peracético apresentou maior custo, comprovando-se assim que o ácido peracético é a melhor alternativa em relação a custo.

5. CONCLUSÕES

Observou-se que o ácido peracético obtém alta eficiência com a menor concentração (0,2%) e o menor tempo de contato (2 minutos) a 10°C. As concentrações de clorexidina e quaternário de amônio são semelhantes, porém o tempo de contato necessário é distinto (2 e 10 minutos, respectivamente). Os ácidos orgânicos necessitam alta concentração (1%) e maior tempo de contato (15 minutos) para alcançar uma performance semelhante.

O ácido peracético é mais eficiente quando aplicado a 10°C do que quando aplicado a 45°C.

Considerando as recomendações dos fornecedores foi possível verificar que o ácido peracético teve um desempenho bom mesmo em concentrações e tempos abaixo dos recomendados pelos fornecedores, o quaternário de amônio teve bom desempenho na concentração recomendada pelo fornecedor, porém mostrou-se eficiente num tempo mais curto.

A clorexidina e o quaternário de amônio tiveram bom desempenho nas concentrações e tempos recomendados pelos fornecedores, sendo que ambos podem ser aplicados para controle dos microrganismos testados, já os ácidos orgânicos não apresentaram eficiência mesmo em concentrações e tempos superiores aos recomendados pelos fornecedores frente ao *Staphylococcus aureus*.

A regressão linear entre o Log de UFC de *L. monocytogenes* e o tempo em minutos com clorexidina a 0,2%, 0,1% e 0,05%, permitiu determinar os valores D nestas concentrações obtendo-se 1,38, 3,087 e 4,81 minutos, respectivamente, fornecendo um valor Z de -0,2788.

Os resultados relacionados a inativação de *L. monocytogenes* indicam um comportamento linear do tempo de redução decimal deste microrganismo frente à clorexidina.

Dentre os sanitizantes testados o ácido peracético apresentou a melhor relação custo benefício, sendo o indicado para controle de todos os microrganismos testados.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se como continuidade do estudo:

- Avaliação da cinética de inativação de *Listeria monocytogenes* em suspensão, usando ácido peracético e quaternário de amônio como agentes ativos;
- Avaliação da resistência dos microrganismos frente à utilização de um sanitizante durante longo período;
- Avaliação da interferência da superfície de contato da eficiência dos sanitizantes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, G.; DEBRAY, E.; CANDAU, Y. & PIAR, G. Mathematical model of thermal destruction of *Bacillus stearothermophilus* spores. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3073-3080, 1990.

ADAMS, C. A. Nutricines. Food components in Health and Nutrition. Nottingham. Nottingham Univ. Press, 1999.

AKERS, M. J.; BOAND, A. V. & BINKLEY, D. A. Preformulation method for parenteral preservative efficacy evaluation. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 73, p. 903-905, 1984.

ALBUQUERQUE, R.; ITO, N.M.K. & MIYAJI, C. I. Tratamento de rações de aves com ácidos orgânicos: estudo da atividade bacteriana e avaliação de técnicas de recuperação de *Salmonella spp.* **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 6, p. 279-282, 1998.

ANDRADE, N. J. & MACEDO, J. A. B. **Higienização na Indústria de Alimentos**, São Paulo, Varela, 1996.

BALL, C. O. Short-time pasteurization of milk. **Industrial and Engineering Chemistry**. v. 35, p. 71-85, 1920.

BALL, C. O. Thermal process time for canned foods. **Bull. Natl. Res. Council** v. 7, p. 37, 1923.

BAMBACE, A. M. J.; BARROS, E. J. A.; SANTOS, S. S. F. & JORGE, A. O. C. Eficácia das soluções aquosas de clorexidina para desinfecção de superfícies. **Revista Biociências (Taubaté)**, v.9, n.2, p.73-81, 2003.

BARBOSA, H. R. & TORRES, B. B. **Microbiologia Básica**. Rio de Janeiro: Atheneu, 196p., 1999.

FRANCHIN, P. R. Comparação de metodologias alternativas para detecção de *Salmonella* sp e *Listeria monocytogenes* em carnes e produtos cárneos. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) Universidade Federal de Santa Catarina, 2008, 114f.

BLOCK, S. S. Disinfection sterilizations and preservation. 4 ed. Philadelphia, PA: Lea e Febiger, 1162p., 1991.

BOLTON, L. F. & FRANK, J. F. Simple method to observe the adaptive response of *Listeria monocytogenes* in food. **Letters in Applied Microbiology**, 29: 350–353, 1999.

BONNET, M. & MONTVILLE, T. J. Acid-tolerant *Listeria monocytogenes* persist in a model food system fermented with nisin-producing bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, p. 237–242, 2005.

BOWER, C. K.; MCGUIRE, J. & DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science & Technology**, v. 7, p. 152-157, 1996.

BRIÑEZ, W. J.; ROIG-SAGUÉS, A. X.; HERRERO, M. H.; LÓPEZ-PEDEMONTE & GUAMIS, B. Bactericidal efficacy of peracetic acid in combination with hydrogen peroxide against pathogenic and non pathogenic strains of *Staphylococcus* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli*. **Food Control**, v. 17, p. 516-521, 2006.

BUSSCHER, H. J.; BOS, R. & VAN DERMEI, H. C. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. **FEMS Microbiology Letters**, v. 128, p. 229-234, 1995.

CAMPBELL, J. E. & DIMMICK, R. L. Effect of 3% hydrogen peroxide on the viability of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 91, p. 925-929, 1966.

CARBALLO, J.; FERREIRO S, C. M. & CRIADO, M.T. Factor analysis in the evaluation of the relationship between bacterial adherence to biomaterials and

changes in free energy. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 7, p. 130-141, 1992.

CHAMBERLAIN, A. H. L. & JOHAL, S. Biofilms on meat processing surfaces. In *Biodeterioration 7* (Eds D. R. Houghton, R. N. Smith, and H. O.W. Eggins) pp. 57-61. London. Elsevier Applied Science, 1988.

CHERRINGTON, C.A.; HINTON, M. & CHOPRA, I. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. **Advances Microbiological Physiology**, v.32, p.87-108, 1991.

CHOCT, M. Effects of Organic Acids, Prebiotics and Enzymes on Control of Necrotic Enteritis and Performance of Broiler Chickens. University of New England Armidale, NSW, 2004.

Circular 1206/2008, CGPE/DIPOA, Ministério da Agricultura.

Circulares 175 e 176 de 16 de Maio de 2005, CGPE/DIPOA, Ministério da Agricultura.

DAVIES, G. E.; FRANCIS, J. MARTIN, A.R.; ROSE, F. L. & SWAIN, G. 1:6-Di-4'-chlorophenyldiguanidohexane (hibitane); laboratory investigation of a new antibacterial agent of high potency. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 9, p. 192-196, 1954.

Decisão 471/2001, Comissão Européia.

DENTON, G. W. **Chlorhexidine**. In: **Disinfection, sterilization and preservation**. Block SS. ed. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 274-289, 1991.

DIEZ-GONZALEZ, F. & RUSSEL, J. B. The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid. **Microbiology**, v. 143, p. 1175-1180, 1997.

DOI/DIPOA. **Autorização de uso de produto (AUP) No 255/99**. Brasília, DF, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1999.

DOMINGUES, P. F. & LANGONI, H. Manejo sanitário animal. Rio de Janeiro: EPUB, p. 210, 2001.

DONNELLY, C.; BRACKETT, R. E. & DOORES, S. *Listeria*. In: VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. (eds.), **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 3. Ed. American Public Health Association Washington. 637-663, 1992.

DOYLE, M. F. Foodborne Bacterial Pathogenes. Nova York, 1989.

EKLUND, T. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH levels. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 54, p. 383-389, 1983.

EKPERIGIN H. E. & NAGARAJA K. V. *Salmonella*. **Microbiology Food Borne Pathogenes**, v.14, p.17-29, 1998.

FARBER, J. M. & PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a foodborne pathogen. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 3, p. 476-511, 1991.

FINZI, M. & COSTA, C. Microbiological contamination in food processing plants. Preventive measures. **Rivista della Societa Italiana di Scienza dell Alimentazione**, v. 8, n. 4, p. 258-261, 1979.

FRANCO, B. D. G. M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Editora Atheneu, 2003.

FRANK, J. F. & KOFFI, R. A. Surface-adherent growth of *Listeria monocytogenes* is associated with increased resistance to surfactant sanitizers and heat. **Journal of Food Protection**, v. 7, p. 550-554, 1990.

FRAZIER, W. C. **Microbiologia de los Alimentos**. Zaragoza, Espanha: Ed. Acribia, 1972.

GARRICK, R.G. & SMITH, A. Evaluation of Rambach agar for the differentiation of *Salmonella* species from other Enterobacteriaceae. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, p. 187-189, 1994.

HOOD, S. K. & ZOTTOLA, E. A. Biofilms in food processing. **Food Control**, v. 6, p. 9-18, 1995.

HUGO, W. B. & RUSSEL, A. D. **Pharmaceutical Microbiology**. 5th ed. Oxford: Blackwell. 245-299, 1992.

INCZE, K. Dry Fermented Sausages. **Meat Science**, v. 49, n. 1, p. 169–177, 1998.

Informes Técnicos Institucionais. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em um evento científico. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 3, p. 515-518, 2005.

JAY, J. M. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. **Food Control**, v. 7, n. 4/5, p. 209-214, 1996.

JEANSONNE, M.J. & WHITE, R. R. A comparison of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigant. **Journal Of Endodontics**, v. 20, p. 276-278, 1994.

JENKINS, S.; ADDY, M. & WADE, W. The mechanism of action of chlorhexidine. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 15, p. 415-424, 1988.

JEONG, D. K. & FRANK, J. F. Growth of *Listeria monocytogenes* at 100C in biofilms with microorganisms isolated from meat and dairy processing environments. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 576-586, 1994.

KORBER, D. R.; CHOI, A.; WOLFAARDT, G. M.; INGHAM, S. C. & CALDWELL, D. E. Substratum topo-graphy influences susceptibility of *Salmonella enteritidis* biofilms

to trisodium phosphate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 3352-3358, 1997.

KORNACKI, J. L. & JOHNSON, J. L. *Enterobacteriaceae*, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators. In: DOWNES, F.P., ITO, K. (Eds). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington: APHA, p. 69-82. 2001.

KRYSINSKI, E. P.; BROWN, L. J. & MARCHISELLO, T. J. Effect of cleaners on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 246-251, 1992.

KUNIGK, L.; GOMES, D. R. & FORTE, F. The influence of temperature on the decomposition kinetics of peracetic acid in solutions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 2, p. 217-220, 2001.

MAFU, A. A.; ROY, D.; GOULET, J. & SAVOIE, L. Characterization of physicochemical forces involved in adhesion of *Listeria monocytogenes* to surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 1969-1973, 1991.

MAZZOLA, P. G.; MARTINS, A. M. S. & PENNA, T. C. V. Determination of decimal reduction (D-value) of chemical agents used in hospital disinfection. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 33-34, 2003.

MCGLAUGHLIN, J. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 63, p. 1-11, 1987.

METTLER, E. & CARPENTIER, B. Variations over time of microbial load and physicochemical properties of floor materials after cleaning in food industry premises. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 57-65, 1998.

MIMS, C.; ROITT, I. M. & PLAYFAIR, J. **Microbiologia médica**. 2. ed. São Paulo: Manole, 584p, 1999.

MÜLLER, G. & WEBER, H. **Mikrobiologie der Lebensmittel**. Behrs`s Verlag, 8 Aufl. p. 562, 1996.

MURIAMA, P. M. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 54-63, 1996.

ORTH, D. S. Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy. **Journal Society of Cosmetic Chemists**, v. 30, p. 321-332, 1979.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N .R.; EDWARDS, D. D. & PELCZAR, M. F. **Microbiologia**. São Paulo: Makron Books do Brasil, Volume I, 1996.

PINI, P. N. & GILBERT, R. J. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. **International Journal of Food Properties**, v. 56, n. 7, p. 616-618, 1993.

Portaria 101 de 11/08/1993 – Anexo Parte IV – Determinações Analíticas - Ministério da Agricultura e do Abastecimento – MAPA, Brasil.

PRÉSTAMO, G. & MANZANO, P. **Peroxidases of select fruits and vegetables and possible use of ascorbic acid as an antioxidant**. Hortscience, Alexandria v. 28, n.1, p. 48-50, 1993.

REN, T. J. & FRANK, J. F. Susceptibility of starved planktonic and biofilm *Listeria monocytogenes* to quaternary ammonium sanitizer as determined by direct viable and agar plate counts. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 573-576, 1993.

ROCOURT, J. & COSSART, P. ***Listeria monocytogenes***. In: DOYLE, M.P.; EUCHAT, L.R.; MONTVILLE, T.J. (Eds). **Food microbiology: fundamentals and frontiers**. Washington: ASM, p. 337-352, 1997.

ROLLA, G. & MELSEN, B. On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. **Journal of Dental Research**, v. 54, p. 57-62, 1975.

ROMÃO, C. M. C. A. Desinfecção e esterilização química. In: TEIXEIRA, P.; VALLE, S. (Org). **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p.133-162, 1996.

RONNER, A. B. & WONG, A. C. L. Biofilm development and sanitizer inactivation of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-N rubber. **Journal of Food Protection**, v. 56, p. 750-758, 1993.

RUSSELL, J.B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal of Applied Bacteriology**, v.73, p.363-370, 1992.

RYSER, E. T. & MARTH, E. H. **Listeria, Listeriosis, and Food Safety**. University of Wisconsin, New York, 1991, 632p.

SANTOS, A. M. & MOURA, A. C. **Perfil de resistência microbiana aos principais sanitizantes utilizados em frigoríficos da cidade de Cascavel no Paraná**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas), Faculdade Assis Gurgacz, Cascavel-PR, 2007.

SINDE, E. & CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluor-ethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, p. 439-447, 2000.

SILVA, F. C.; PARADELLA, T. C.; NAVA, E. A. F. A.; CLARO, P. A. R. A.; KOGA-ITO, C.Y. & JORGE, A. O. C. Influência de agentes desinfetantes sobre a aderência de *Staphylococcus aureus* em aço inoxidável. **Ciência Odontológica Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 60-65, 2008.

SILVA, J. A.; SOARES L. F. & COSTA, E. L. Sanitização de Carcaças de Frango com Soluções de Ácidos Orgânicos Comerciais e Suco de Limão - **Revista Tecnologia da Carne**. Campinas, SP, v.3, n.1, p.19-26, 2001.

SILVA, M. C. C. Ocorrência de *Listeria* spp. em embutidos cárneos artesanais comercializados no mercado varejista da cidade de Contagem, MG. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1996, 76f.

SILVA, W. P.; LIMA, A. S.; GANDRA, E. A.; ARAUJO, M. R.; MACEDO, M. R. P. & DUVAL, E. H. *Listeria* spp. no processamento de lingüiça frescal em frigoríficos de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, n. 3, p. 911-916, 2004.

STUMBO, C. R. Bacteriological considerations relating to process evaluation. **Food Technology**, v. 2, p. 115-132, 1948a.

STUMBO, C. R. A technique for studying resistance of bacterial spores to temperatures in the higher range. **Food Technology**, v. 2, p. 228-240, 1948b.

SUTTON, S. V. W.; WRZOCEK, T. & PROUD, D. W. Neutralization efficacy of Dey-Engley medium in testing of contact lens disinfecting solutions. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 351-354, 1991.

THÉVENOT, D.; DELIGNETTE-MULLER, M. L.; CHRISTIEANS, S. & VERNZOY-ROZAND, C. Fate of *Listeria monocytogenes* in experimentally contaminated French sausages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 101, p. 189-200, 2005.

TOMPKIN, R. B.; SCOUT, V. N.; BERNARD, D.T.; SVEUM, W. H. & GOMBAS, K.S., Pautas para prevenir la contaminación com *Listeria monocytogenes* después del procesamiento. **Dairy Food and Environmental Sanitation**, v. 21, p. 381-395, 2001.

TURNERS, F. J. **Hydrogen peroxide and other oxidant disinfectants**, p. 240-250. In: S. S. BLOCK (ed.), *Disinfection, sterilization, and preservation*, 3rd ed. Lea & Feabiger, Philadelphia. 1983.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Testing guidelines for class III soft (hydrophilic) contact lens solutions (draft)**. U.S. Food and Drug Administration, Washington, D.C. 1985.

UYTTENDALE, M. R.; NEYTS, K. D.; LIPS, R. M. & DEBEVERE, J. M. Incidence of *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products obtained from Belgian and French abbatoirs. **Food Microbiology**, v.14, n. 4, p. 339-345, 1997.

VANDEVIVERE, P. & KIRCHMAN, D. L. Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 3280-3286, 1993.

VARABIOFF, Y. Incidence of *Listeria* in small goods. **Letters in Applied Microbiology**, v.14, p. 167–169, 1992.

WILEY, R. C. **Minimally processed refrigerated fruits and vegetables**. New York: Chapman and Hall, 1994, 368p.

WONG, A. C. L. Biofilms in food processing environments. **Journal of Dairy Research**, v. 81, p. 2765-2770, 1998.