



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE PESCA

ARTAMIZIA MARIA NOGUEIRA MONTEZUMA

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA ANTIMICROBIANA DAS SOLUÇÕES
SANITIZANTES USADAS NA HIGIENIZAÇÃO DE UM ENTREPOSTO DE
PESCADO

FORTALEZA

2013

ARTAMIZIA MARIA NOGUEIRA MONTEZUMA

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA ANTIMICROBIANA DAS SOLUÇÕES SANITIZANTES
USADAS NA HIGIENIZAÇÃO DE UM ENTREPOSTO DE PESCADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Orientador: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- M790a Montezuma, Artamizia Maria Nogueira.
Avaliação da eficiência antimicrobiana das soluções sanitizantes usadas na higienização de um
entrepósito de pescado. / Artamizia Maria Nogueira Montezuma.- 2013.
85f. : il. , enc. ; 30 cm.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Departamento
de Engenharia de Pesca, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.
Orientação: Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira.
1. Indústria pesqueira. 2. Lagosta. 3. Desinfecção e desinfetantes. I. Título.

CDD 639.2

ARTAMIZIA MARIA NOGUEIRA MONTEZUMA

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA ANTIMICROBIANA DAS SOLUÇÕES SANITIZANTES
USADAS NA HIGIENIZAÇÃO DE UM ENTREPOSTO DE PESCADO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Engenharia de Pesca. Área de concentração: Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca.

Aprovada em: 28 /02 / 2013.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Silvana Saker Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Suzana Cláudia Silveira Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Profa. Dra. Dália dos Prazeres Rodrigues
Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)

*Ao meu esposo Osmar e aos
nossos amados filhos Manuella e
Luis Gustavo pela torcida
positiva para a conclusão do
curso de doutorado*

AGRADECIMENTOS

À Deus, governante maior das nossas vidas, que me reservou esse desfecho acadêmico.

À minha orientadora professora Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira pelo desafio de “me fazer doutora”. Mulher sábia e determinada.

Às professoras componentes da banca examinadora pelo tempo dedicado à leitura deste trabalho para que ele obtivesse uma boa qualidade acadêmica.

Às professoras Silvana Saker Sampaio e Oscarina Viana de Sousa pelas contribuições dadas a este trabalho.

Aos Engenheiros de Pesca José Teixeira de Abreu Neto, Francisco Heberon Oliveira da Silva e Gillyane Rodrigues Melo da Interfrios – Intercâmbio de Frios S/A que permitiram e facilitaram as coletas das amostras para a realização deste trabalho.

À Engenheira de Alimentos Sônia Coelho Abreu de Oliveira do Laboratório de Microbiologia da Fundação Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará (NUTEC) que me proporcionou o treinamento inicial no Método da Diluição de Uso e pelo empréstimo dos cilindros carregadores.

À Diretora da Divisão de Alimentos e Química do NUTEC, Solange Maria Bastos Girão por permitir, sempre com muita solicitude, a execução das análises de teor de cloro residual livre e do pH das amostras dos sanitizantes.

Ao doutorando em Engenharia de Pesca Rafael Santos Rocha pela valiosa ajuda nas análises microbiológicas dos testes empregados e na ordenação deste trabalho.

Ao professor Ernesto Hofer, da Fundação Oswaldo Cruz/MS, pelo envio das cepas bacterianas, essenciais para a realização dos testes com os desinfetantes.

Aos professores do Departamento de Engenharia de Pesca (DEP)/UFC e, em especial, ao professor Moisés Almeida de Oliveira, chefe do DEP que contribuiu efetivamente para a redução da minha atividade acadêmica, permitindo dessa forma minha maior dedicação a tese

Às minhas jovens colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (Labomar) pelo bom e alegre convívio, em especial, Lana Oliveira Leite e Daniel Rodrigues dos Santos pela ajuda nas coletas das amostras.

À minha mãe Raimunda Nogueira Montezuma pelo que ela transmite à minha vida, serenidade, força, pensamentos positivos, que indiretamente contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Ao meu marido Osmar Frota Herbster pelo incentivo à realização do curso de doutorado e pela tolerância das minhas ausências. *Merci, mon couer.*

“Viver!

E não ter a vergonha
de ser feliz.

Cantar e cantar e cantar
a beleza de ser
um eterno aprendiz”

(Gonzaguinha)

RESUMO

Os Métodos da Diluição de Uso (MDU) e da Suspensão da AOAC são oficialmente aceitos no Brasil na avaliação da eficiência antimicrobiana de desinfetantes, para fim de registro comercial. O estudo teve como objetivo determinar a eficiência antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações 5, 100 e 200mg/L e de cloreto de benzalcônio a 77 e 10.000mg/L e avaliar os processos de higienização das mãos e botas dos manipuladores e das caudas de lagosta, como matéria-prima, em um Entreposto de Pescado na cidade de Fortaleza-CE. Os testes aplicados aos desinfetantes foram MDU (INCQS/POP Nº65.3210.007) que utiliza as cepas padrão *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Choleraesuis* e *Escherichia coli* e Suspensão (AOAC 960.09) que testa os desinfetantes contra *S. aureus* e *E.coli*. Foi verificada a eficácia dos procedimentos de higienização das mãos e botas dos manipuladores e das caudas de lagostas através da redução decimal (RD) das bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC), de amostras colhidas durante o processamento. Procedeu-se a contagem bacteriana através do método de Contagem Padrão em Placas (CPP) pelas técnicas *pour plate* (mãos e botas) e *spread plate* (caudas), utilizando-se Ágar Extrato Glicose Triptona (TGEA), e os resultados foram expressos em UFC/mão, UFC/cm² e UFC/cauda. As soluções de hipoclorito de sódio foram reprovadas pelo MDU nas concentrações 5, 100 e 200 mg/L e aprovadas (RD > 5 ciclos logarítmicos) em pelo menos uma repetição para o teste da Suspensão. As soluções do cloreto de benzalcônio foram aprovadas nos dois testes apresentando melhor eficiência microbiológica para o teste de suspensão (RD >5 ciclos logarítmicos) na concentração 10.000 mg/L. As RD das mãos e das botas dos manipuladores e das caudas de lagosta foram respectivamente < 0,8, < 0,6 e < 0,6 ciclo logarítmico. O MDU e o Método da Suspensão mostraram concordância parcial na aprovação antimicrobiana das soluções tendo esse último maior número de aprovações. A carga microbiana inicial definiu a boa eficiência do processo de higienização para a matéria-prima e mãos e a ineficiência para as botas no Entreposto de Pescado. As RD encontradas para as cepas padrão (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), analisadas pelo método da Suspensão testando hipoclorito de sódio e cloreto de benzalcônio foram maiores do que aquelas RD encontradas para BHC após o processo de higienização das mãos, botas e caudas de lagosta.

Palavras-chave: Diluição de uso. Suspensão. Desinfetante. Manipuladores. Lagosta.

ABSTRACT

The AOAC use-dilution method (UDM) and suspension method are officially accepted in Brazil for the evaluation of the antibacterial efficiency of disinfectants when applying for product registration. The purpose of this study was to determine the antibacterial efficiency of solutions of sodium hypochlorite at 5, 100 and 200mg/L and benzalkonium chloride at 77 and 10,000mg/L, and to evaluate the procedures employed to disinfect raw material (lobster tails) and the hands and boots of handlers at a seafood processing facility in Fortaleza city. The disinfectants were tested with UDM (INCQS/POP N^o65.3210.007) using standard strains of *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Choleraesuis* and *Escherichia coli*, and with the suspension method (AOAC 960.09) using *S. aureus* and *E. coli*. The hygienization procedures for hands, boots and raw material were evaluated by decimal reduction (DR) of aerobic mesophiles in samples collected during processing. The bacteria were quantified by standard plate count (pour plate for hands and boots; spread plate for tails) in Tryptone Glucose Extract agar, and results were expressed as CFU/hand, CFU/cm² and CFU/tail. The sodium hypochlorite solutions failed the UDM test at all concentrations, but were approved (DR >5) in the suspension test for at least one repetition. The benzalkonium chloride solutions were approved with both methods, with the best performance observed for the suspension method (DR >5log) at 10.000 mg/L. DR values were <0.8 (hands), <0.6 (boots) and <0.6 (tails). The two methods (UDM and Suspension) were in partial agreement regarding the approval of solutions, but the latter method yielded a greater number of approvals. Due to differences in the initial bacterial load, the hygienization procedures were efficient for hands and lobster tails but inefficient for boots. DR values were significantly higher for standard strains (*S. aureus* and *E. coli*) tested with the suspension method using sodium hypochlorite and benzalkonium chloride than for aerobic mesophiles following the hygienization of hands, boots and lobster tails sampled at the seafood processing facility.

Key words: Use-dilution method. Suspension method. Disinfectant. Handlers; Lobster.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Esquema das reações químicas no processo de cloração da água.....	24
Figura 2 –	Fórmula geral das amônias quaternárias (a) e fórmula estrutural do cloreto de benzalcônio (b)	26
Figura 3 –	Fórmula estrutural do triclosan (éter 2, 4, 4 tricloro hidroxidifenílico)	40
Figura 4 –	Preparo do inóculo da cultura teste para o Método da Diluição de Uso (INCQS/POP N° 65.3210.007).....	46
Figura 5 –	Aspecto dos tubos de ensaio evidenciando presença (P) e ausência (N) de turvação no Método da Diluição de Uso (INCQS/POP N° 65.3210.007).....	47
Figura 6 –	Fluxograma do procedimento do Método da Diluição de Uso (INCQS/POP N° 65.3210.007)	48
Figura 7 –	Placa de Petri com cilindros de aço inoxidável contaminados e secos (a) e tubos de ensaio com cilindros em contato com solução desinfetante (b)	48
Figura 8 –	Esquema das transferências dos cilindros (carreadores) da solução desinfetante para os tubos de subcultivos.....	49
Figura 9 –	Preparo do inóculo da cepa padrão para o uso no Método da Suspensão (AOAC 960.09).....	50
Figura 10 –	Procedimento do Método da Suspensão (AOAC 960.09) para os desinfetantes hipoclorito de sódio (5, 100 e 200 mg/L) e cloreto de benzalcônio (77 mg/L) contra as cepas <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 e <i>Escherichia coli</i> ATCC 11.229.....	51
Figura 11 –	Procedimento do Método da Suspensão adaptado (OKAZAKI, 2003) para desinfetante a base de quaternário de amônia com concentração ≥ 200 mg/L	52
Figura 12 –	Fluxograma do procedimento de higienização e pontos de coletas das amostras das mãos e das botas dos manipuladores em um Entrepósito de Pescado em Fortaleza, Ceará	53
Figura 13 –	Regiões de coleta por <i>swab</i> na mão: (a) <i>swab</i> do antebraço até a palma da mão, (b) <i>swab</i> no dedo e (c) <i>swab</i> no entorno da mão	54
Figura 14 –	Regiões de coleta das botas por <i>swab</i> : (a) dorso (1) e laterais (2 e 3) e (b) sola.....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 –	Entrepósitos de Pescado do Estado do Ceará com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF).....	20
Quadro 2–	Métodos Oficiais de Análises para desinfetantes químicos da <i>Association of Official Analytical Chemists</i> (AOAC).....	31
Quadro 3 –	Exemplo de um resultado da avaliação de um desinfetante utilizando-se o Método da Suspensão.....	37
Quadro 4 –	Substâncias neutralizantes para uso em desinfetantes de acordo com o princípio ativo.....	37
Quadro 5 –	Faixas de contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis das mãos (UFC/mão) e das botas (UFC/cm ²) dos manipuladores	55

LISTA DE TABELAS

Tabela1 –	Resultados dos tubos positivos para as bactérias padrão: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella Choleraesuis</i> e <i>Escherichia coli</i> , utilizando-se soluções de hipoclorito de sódio (5, 100 e 200 mg/L) em 10 tubos por cepa no Método da Diluição de Uso (INCQS/POP N°65.3210.007)	59
Tabela 2 –	Resultado dos tubos positivos para as bactérias padrão: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella Cholerasusis</i> , <i>Escherichia coli</i> utilizando-se soluções de cloreto de benzalcônio (77, 10.000 mg/L) em 10 tubos por cepa, no Método da Diluição de Uso (INCQS/POP N°65.3210.007)	62
Tabela3 –	Reduções decimais (ciclos logarítmicos) da população bacteriana quando testadas soluções de hipoclorito de sódio em concentrações 5, 100 e 200 mg/L contra as cepas padrão <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> utilizando-se o Método da Suspensão (AOAC 960.09)	63
Tabela 4 –	Reduções decimais (ciclos logarítmicos) da população bacteriana quando testadas soluções de quaternário de amônia (cloreto de benzalcônio) em concentrações 77 e 10.000 mg/L contra as cepas padrão <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> ,utilizando o Método da Suspensão (AOAC 960.09).....	64
Tabela5 –	Comparação dos resultados obtidos através do Método da Diluição de Uso (INCQS/POP N° 65.3210.007) e o Método da Suspensão (AOAC, 960.09) com relação à porcentagem de concordância na aprovação ou reprovação das amostras, quando utilizadas as concentrações de hipoclorito de sódio (5, 100 e 200 mg/L).....	65
Tabela 6 –	Comparação dos resultados obtidos através do Método da Diluição de Uso (INCQS/POP N° 65.3210.007) e o Método da Suspensão (AOAC, 960.09) com relação à porcentagem de concordância na aprovação ou reprovação das amostras, quando utilizadas as concentrações de cloreto de benzalcônio (77 e 10.000 mg/L)	65
Tabela7 –	Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (UFC/mão) das mãos dos manipuladores, antes (M ₁) e após (M ₂) a lavagem e após a sanitização (M ₃) no Entrepasto de Pescado em Fortaleza-CE	67

Tabela 8 –	Valores percentuais das faixas de contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (UFC/mão) após os procedimentos de lavagem (M ₂) e de sanitização (M ₃) das mãos dos manipuladores no Entrepasto de Pescado em Fortaleza-CE	67
Tabela 9 –	Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (logUFC/mão) das mãos dos manipuladores no Entrepasto de Pescado, Fortaleza-CE, antes (M ₁) e após (M ₂) a lavagem e após a sanitização (M ₃) e Reduções Decimais (RD) das contagens bacterianas após a lavagem e a sanitização	69
Tabela 10 –	Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (UFC/cm ²) das botas dos manipuladores no Entrepasto de Pescado, Fortaleza-CE, antes da lavagem (B ₁) e após a sanitização (B ₂) e valores percentuais das faixas de contagens bacterianas após a sanitização	70
Tabela 11 –	Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (logUFC/cm ²) das botas dos manipuladores antes da lavagem (B ₁) e após a sanitização (B ₂) e Reduções Decimais (RD) após a sanitização no Entrepasto de Pescado em Fortaleza-CE.....	71
Tabela 12 –	Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (UFC/cauda e logUFC/cauda) das caudas das lagostas comercializadas no Entrepasto de Pescado, Fortaleza-CE, antes (L ₁) e após (L ₂) a lavagem e Reduções Decimais (RD) após a lavagem.....	73
Tabela 13 –	Concentrações de cloro residual livre (CRL) das amostras de hipoclorito de sódio declaradas pelo fornecedor e as analisadas e pH analisados das amostras	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHC	Bactérias Heterotróficas Cultiváveis
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CPP	Contagem Padrão em Placas
CRL	Cloro residual livre
SFA-CE	Superintendência Federal de Agricultura no Estado do Ceará
DIPES	Divisão de Inspeção de Pescado e Derivados
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HAACP	<i>Hazard Analysis and Critical Control Points</i>
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
LABOMAR	Laboratório de Ciências do Mar
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MDU	Método da Diluição de Uso
NaClO	Hipoclorito de sódio
OCl⁻	Íon hipoclorito
NUTEC	Núcleo de Tecnologia Industrial do Ceará
PPHO	Procedimentos Padrões de Higiene Operacional
RD	Redução Decimal
SSOP	<i>Sanitation Standard Operating Procedures</i>
SIF	Serviço de Inspeção Federal
TGEA	<i>Tryptone Glucose Extrato Agar</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
	
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Entrepasto de pescado e Programas de qualidade	20
2.2	Sanitizantes usados no Entrepasto de pescado	22
2.2.1	<i>Hipoclorito de sódio</i>	23
2.2.2	<i>Quaternário de amônia</i>	25
2.3	Ação dos sanitizantes sobre os micro-organismos	26
2.4	Micro-organismos usados para avaliação da atividade antimicrobiana	27
2.5	Métodos para comprovação da eficiência antimicrobiana dos desinfetantes	29
2.5.1	<i>Método da Diluição de Uso da AOAC (INCQS/POP Nº65.3210.007)</i>	32
2.5.2	<i>Método da Suspensão (AOAC 960.09)</i>	36
2.6	Substâncias neutralizantes da ação dos desinfetantes	37
2.7	Gabinete de higienização dos manipuladores nos Entrepastos de Pescado	38
2.8	Higienização das mãos e botas dos manipuladores no Entrepasto de Pescado	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
	
3.1	Local de trabalho	43
3.2	Definição das soluções dos desinfetantes usadas	43
3.3	Métodos utilizados para verificação da eficiência antimicrobiana das soluções desinfetantes	45
3.3.1	<i>Método da Diluição de Uso (INCQS/POP Nº 65.3210.007)</i>	45
3.3.1.1	<i>Soluções</i>	<i>desinfetantes</i> 45
3.3.1.2	<i>Micro-organismos</i>	<i>teste</i> 45
3.3.1.3	<i>Preparo dos cilindros carreadores</i>	45
3.3.1.4	<i>Preparo do inóculo</i>	46
3.3.1.5	<i>Procedimento</i>	<i>da análise</i> 46
	

3.3.2	Método da Suspensão (AOAC 960.09)	49
3.3.2.1	<i>Soluções</i>	49
	
3.3.2.2	<i>Micro-organismos</i>	49
	
3.3.2.3	<i>Preparo da suspensão bacteriana</i>	50
3.3.2.4	<i>Procedimento</i>	51
	
3.4	Métodos para verificação de bactérias heterotróficas cultiváveis nas mãos e botas dos manipuladores e das caudas de lagosta	53
3.4.1	<i>Pontos de coletas das amostras das mãos e botas dos manipuladores.</i>	53
3.4.2	<i>Análise microbiológica das mãos e das botas dos manipuladores</i>	53
3.4.3	<i>Análise microbiológica das caudas de lagosta</i>	56
3.5	Análise estatística	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Eficiência antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio utilizando o Método da Diluição de Uso (INCQS/POP Nº 65.3210.007)	58
4.2	Eficiência antimicrobiana das soluções de Quaternário de amônia (cloreto de benzalcônio) utilizando o Método da Diluição de Uso (INCQS/POP Nº 65.3210.007)	61
4.3	Eficiência antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio utilizando o Método da Suspensão (AOAC 960.09)	62
4.4	Eficiência antimicrobiana das soluções de quaternário de amônia (cloreto de benzalcônio) utilizando o Método da Suspensão (AOAC 960.09)	63
4.5	Repetibilidade dos Métodos: Diluição de Uso e Suspensão	64
4.6	Contagem Padrão em Placas (CPP) das bactérias heterotróficas cultiváveis nas mãos e nas botas dos manipuladores e nas caudas das lagostas	66
4.6.1	<i>Contagem Padrão em Placas (CPP) das mãos e das botas dos manipuladores</i>	66
	.	
4.6.2	<i>Contagem Padrão em Placas (CPP) das caudas das lagostas</i>	72
5	CONCLUSÕES	76
6	RECOMENDAÇÕES	77

REFERÊNCIAS..... 78

1 INTRODUÇÃO

A palavra sanitização é derivada do latim *sanitas* que significa saúde. É considerada uma ciência aplicada devido a sua importância para a proteção da saúde humana relacionada aos fatores ambientais. As aplicações dessa ciência referem-se às práticas higiênicas designadas para manter ambientes limpos e saudáveis para a produção, processamento e armazenamento de alimentos (MARRIOTT; GRAVANI, 2006).

Os micro-organismos são as formas de vida mais difundidas na natureza. Sua presença tem efeitos positivos e negativos para a vida do homem, conseqüentemente, seu controle é fundamental para evitar os efeitos indesejáveis à saúde, ao meio ambiente e aos bens que fazem a qualidade de vida do ser humano (BRASIL, 2007a).

As indústrias que processam alimentos perecíveis, como os Entrepósitos de pescado, trabalham em ambientes úmidos nos quais as condições são mais favoráveis à proliferação microbiana e seguem protocolos particulares de higienização. Os programas de higienização industrial envolvem limpeza e desinfecção. A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies e utiliza água e detergente. A etapa posterior de desinfecção objetiva eliminar micro-organismos patogênicos e reduzir o número dos deterioradores para níveis considerados seguros, de modo a produzir um produto de boa qualidade higiênico-sanitária (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

A higienização se insere nos Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO) que criam as condições para a implantação do programa Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), visando obter alimentos seguros, sob os aspectos relacionados às contaminações com agentes químicos, físicos e microbiológicos (BRASIL, 1998). Assim um programa de sanitização efetivo é essencial para aumentar a qualidade do produto e a sua vida útil porque a população microbiana pode ser reduzida.

A premissa dos programas de higienização industrial fundamenta-se na responsabilidade dos estabelecimentos de garantir a qualidade higiênico-sanitária e tecnológica dos seus produtos, através de um Sistema de Controle de Qualidade capaz de se antecipar ao aparecimento dos perigos à saúde pública e de outros atributos de qualidade, gerando registros e informações, de forma que o Sistema possa sofrer, continuamente, a verificação do Serviço Oficial de Inspeção de Produtos de Origem Animal.

Os sanitizantes químicos comerciais usados nos entrepostos de pescado têm aprovação e registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS), conforme o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação

Antimicrobiana (BRASIL, 2007a). As mudanças de uso das substâncias químicas deverão ser comunicadas ao órgão de fiscalização sanitária do Departamento Nacional de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA).

As comprovações da eficiência microbiológica dos sanitizantes químicos são necessárias, e uma das formas de se verificar é através de testes laboratoriais. As análises com o objetivo de aprovação de registro comercial devem ser realizadas no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), na rede oficial de laboratórios do MAPA, ou em laboratórios credenciados especificamente para este fim, obedecidos os métodos e procedimentos preconizados pelo INCQS/FIOCRUZ (ANDRADE; CARELLI; MARTINS, 2008).

No Brasil, os produtos com ação antimicrobiana deverão ter sua eficácia comprovada mediante a metodologia recomendada pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos e adotada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) ou pelos métodos adotados pelo Comitê Europeu de Normalização (BRASIL, 1999). São considerados como oficiais para a determinação da eficácia antimicrobiana desses produtos os métodos da Diluição de Uso (MDU) AOAC 955.14 com o uso de *Salmonella enterica*, AOAC 955.15 com *Staphylococcus aureus*, AOAC 964.02 com *Pseudomonas aeruginosa* e o método da Suspensão (AOAC 960.09), cuja principal diferença entre eles é a forma como os micro-organismos são expostos à ação do desinfetante (BRASIL, 2007a).

Baseado nas metodologias da diluição de uso da AOAC, o INCQS elaborou o Procedimento Operacional Padronizado aplicado na análise da eficiência antimicrobiana dos desinfetantes. Os micro-organismos teste especificados para as indústrias alimentícias são *Staphylococcus aureus* INCQS N^o00039 (ATCC 6538), *Salmonella Choleraesuis* INCQS N^o 00028 (ATCC 10708) e *Escherichia coli* INCQS N^o 00032 (ATCC 11229) (BRASIL, 2009a).

O MDU tem sido constantemente questionado por alguns pesquisadores desde sua adoção no Brasil pelo Ministério da Saúde, em 1985. No início, muitos desinfetantes de uso hospitalar, institucional e doméstico foram desqualificados por não atingirem os padrões de atividade antibacteriana. A metodologia pode qualificar, ou não, um mesmo produto, dependendo do laboratório que realiza o rigoroso e trabalhoso método (TIMENESTSTKY, 1990; TIMENESTSTKY, 2002).

Ao longo dos anos, um grande número de pesquisadores relata que um dos principais fatores causadores da variabilidade dos resultados inter e entre laboratórios é a ausência de procedimentos do método para assegurar a densidade celular do inóculo e a falta

de padronização da população microbiana aderida aos cilindros carreadores. Essa variabilidade foi significativamente minimizada pela inclusão de uma simples etapa de diluição da cultura. Alguns trabalhos também mostram que a adesão das células bacterianas aos cilindros varia de acordo com a cultura empregada, o material e a disparidade física dos cilindros (ARLEA *et al.*, 2008; COLE; RUTALA; CARSON, 1987; OMIDBAKSH, 2012; TOMASINO; FIUMARA; COTTRILL, 2006; TOMASINO; PINES; HAMILTON, 2009; TOMASINO; PINES; HAMILTON, 2012).

O Método da Suspensão é também usado para a comprovação da eficiência antimicrobiana de sanitizantes. É um método quantitativo, mais simples, menos trabalhoso e mais barato do que o MDU. Os resultados são apresentados na forma de reduções decimais (RD) da população microbiana de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Escherichia coli* (ATCC 11229), enumerando-se os micro-organismos sobreviventes após o contato com o desinfetante, não exigindo a eliminação completa como ocorre com o MDU. Esse teste é amplamente aceito nos países europeus (ANDRADE; CARELLI; MARTINS, 2008) e por ter sua execução mais simples, o torna mais indicado aos laboratórios públicos e privados que fazem avaliação da eficiência microbiológica de desinfetantes (OKAZAKI, 2003). Esse método deve ser aplicado para os sanitizantes à base de quaternário de amônia, em concentrações ≤ 200 mg/L, pois em valores superiores a etapa de neutralização do desinfetante se torna mais crítica. Okazaki (2003) adaptou o método para cloreto de benzalcônio substituindo a etapa de neutralização por filtração com subsequente enxágue das membranas com neutralizante (lecitina + tween 80) ou tampão fosfato.

A reprodutibilidade dos testes empregados no MDU da AOAC para atividade bactericida de desinfetantes, requerida pela EPA desde 1953 para fins de regulamentação tem sido questionada por vários pesquisadores (OMIDBAKSH, 2012). Considerando que é um dos métodos usados no Brasil e ainda, diante da limitação do Método da Suspensão para soluções de quaternário de amônia ≥ 200 mg/L, procurou-se verificar a resposta desses testes, qualitativo e quantitativo, para as soluções sanitizantes utilizadas, rotineiramente, no Entrepósito de Pescado escolhido para este estudo por representarem condições das plantas industriais exportadoras do Estado do Ceará, quanto ao cumprimento das normas higiênico-sanitárias e quanto ao uso dos princípios ativos dos desinfetantes comerciais.

Dessa forma, objetivou-se determinar e comparar a eficiência antimicrobiana das soluções sanitizantes de hipoclorito de sódio e de quaternário de amônia através do MDU da AOAC (INCQS/POP N^o 65.3210.007) e do Método de Suspensão (AOAC 960.09) e avaliar a eficiência do processo de higienização das mãos e botas dos manipuladores e das caudas de

lagostas como matéria-prima, através das RD das bactérias heterotróficas cultiváveis em um Entrepasto de Pescado em Fortaleza-CE.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Entrepasto de pescado e Programas de qualidade

Entrepasto de Pescado e Derivados é uma das classificações adotadas para estabelecimentos de pescado. Por definição, são as indústrias dotadas de dependências, instalações e equipamentos adequados ao recebimento, lavagem, manipulação, fracionamento, acondicionamento, frigorificação, estocagem, distribuição ou comercialização do pescado e derivados, dispendo ou não de instalações para o aproveitamento de produtos não comestíveis (BRASIL, 2010a). Entende-se por pescado, os peixes, crustáceos, moluscos, anfíbios, répteis, equinodermos e também gastrópodes terrestres destinados à alimentação humana (BRASIL, 2010b).

No Estado do Ceará estão incluídos nessa classificação doze estabelecimentos, habilitados para a comercialização interestadual e internacional com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF), desenvolvendo atividades próprias para obtenção de produtos de pescado frescos ou congelados (Quadro 1).

Quadro 1 – Entrepastos de Pescado do Estado do Ceará com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF).

SIF	Razão social	Localidade
349	IPESCA INDÚSTRIA DE FRIO DE PESCA S.A	Fortaleza
971	ICAPEL – ICAPUÍ PESCA LTDA.	Icapuí
1768	PESQUEIRA MAGUARY LTDA.	Camocim
2370	INTERFRIOS – INTERCÂMBIO DE FRIOS S.A.	Fortaleza
2674	M.A. de LIMA LOIOLA	Acaraú
2736	CARCINICULTURA GALVÃO	Jaguaruana
3108	LA MAREA IND. E COMERCIO LTDA	Fortaleza
3218	MONTEIRO INDÚSTRIA DE PESCADO LTDA	Itarema
3465	COMPESCAL COMERCIO DE PESCADO DE ARACATIENSE LTDA.	Aracati
3992	R&B COMÉRCIO AQUACULTURA	São Gonçalo do Amarante
4164	CAJUCOCO AQUACULTURA E AGROINDÚSTRIA LTDA.	Itarema
4492	MARICULTURA	Acaraú

Fonte: Serviço de Inspeção Federal (SIF) – Superintendência Federal de Agricultura no Estado do Ceará (SFA-CE), MAPA (SFA – CE,2012).

Costuma-se identificar por siglas, os departamentos, serviços ou divisões federais relacionados com pescado e derivados assim como os programas de qualidade que são gerados por esses órgãos para serem implantados e seguidos pelos Entrepósitos de Pescado (BRASIL, 2010a). Esses estabelecimentos seguem normas da legislação da Divisão de Inspeção de Pescado e Derivados (DIPES) do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do MAPA, repassadas e orientadas através da Superintendência Federal de Agricultura (SFA) dos estados federativos. As instruções, publicadas na forma de portarias, ofícios, circulares, resoluções e outros estão em consonância com acordos internacionais da legislação dos países importadores e da legislação nacional.

Existem outras entidades federais que colaboram com a legislação aplicada a produtos industrializados de pescado como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (BRASIL, 2007a; BRASIL, 2010c).

O DIPOA estabeleceu a partir de 2010 os procedimentos e os modelos de formulários para a realização dos registros para as verificações oficiais dos autocontroles dos estabelecimentos de pescado e derivados, sob o regime do SIF. Foram revisadas e adequadas as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e os Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO) que são pré-requisitos do programa APPCC (BRASIL, 1996; BRASIL, 1998; BRASIL, 2009b).

Os programas de controle surgiram pelo desencadeamento de eventos de doenças veiculadas por alimentos ocasionadas por micro-organismos chamados emergentes. A partir de 1996 os Estados Unidos passaram a exigir que as empresas produtoras de alimentos de origem animal estabelecessem *Sanitation Standard Operating Procedures* (SSOP) ou PPHO, com o objetivo de implementar o sistema de redução de patógenos buscando assim, diminuir a incidência de doenças veiculadas por alimentos de origem animal. A maioria dos casos de enfermidades transmitidas por alimentos está envolvida com práticas operacionais inadequadas do ponto de vista higiênico-sanitário.

Os PPHO são procedimentos descritos, desenvolvidos, implantados e monitorados, visando estabelecer a forma rotineira pela qual o estabelecimento industrial de alimentos evitará contaminação direta ou cruzada e adulteração do produto, preservando a sua qualidade e integridade por meio da higiene antes, durante e depois das operações industriais.

O programa APPCC ou *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HAACP), como é internacionalmente conhecido, é adotado pelos principais mercados mundiais e

basicamente assegura que os produtos industrializados sejam elaborados sem riscos à saúde pública, apresentem padrões uniformes de identidade e qualidade e atendam às legislações nacionais e internacionais, no que diz respeito aos aspectos sanitários de qualidade e de integridade econômica. Esse programa controla os perigos físicos, químicos e biológicos, através de sete princípios: identificação e avaliação dos perigos, identificação dos pontos críticos de controle (PCC), estabelecimento dos limites críticos, estabelecimento dos procedimentos de monitoração, estabelecimento das ações corretivas, estabelecimento dos procedimentos de verificação e estabelecimento dos procedimentos de registros. Seu sucesso está, fundamentalmente, ligado à implantação de pré-requisitos (PPHO) que fornecem as condições operacionais e ambientais básicas para a produção de alimentos inócuos e saudáveis.

A limpeza e a sanitização são itens específicos dos PPHO que fazem parte das BPF e estão sujeitos à verificação *in loco*, em fiscalização de rotina do SIF local e à verificação documental realizada, quadrimestralmente, pelas supervisões e auditorias do DIPES/DIPOA (BRASIL, 2009a).

Os cuidados com a higiene independem de se tratar de plantas industriais higienicamente desenhadas ou antigas. Pelos números dos registros no SIF (Quadro 1) observa-se que existem Entrepósitos de pescado modernos e antigos. Contudo, se as práticas sanitárias não são seguidas nos estabelecimentos podem acontecer no mercado consideráveis perdas econômicas e de reputação.

Os Entrepósitos de produtos de pescado e derivados contam com um amplo referencial teórico, sob a forma de Resoluções, Portarias, Circulares, encaminhados pelo DIPES/DIPOA, que dá suporte a constante atualização de seus programas de qualidade, implantados em atendimento às exigências internacionais.

2.2 Sanitizantes usados no Entrepósito de pescado

Os entrepostos de pescado cumprem programas higiênicos para controlar a contaminação por micro-organismos, que são os principais responsáveis pela deterioração dos alimentos e transmissão de doenças ao homem. As fontes de disseminação são principalmente a matéria-prima e os manipuladores, que estão em contato direto com o pescado.

A higienização industrial é normalmente constituída de duas etapas: a limpeza, responsável por retirar compostos de origem inorgânica e orgânica com o uso de detergentes, e a sanitização, realizada por meios físicos ou químicos, que visa remover os micro-organismos até níveis compatíveis com as exigências da Saúde Pública (ANDRADE PINTO, ROSADO,

2008). Para alcançar esses objetivos uma etapa é dependente da outra. Uma desinfecção sem limpeza prévia resulta em um processo antieconômico pela limitação da ação do desinfetante, e uma limpeza sem desinfecção posterior resulta em um processo higiênico insuficiente, por não alcançar o controle microbiano.

Sanitizante é um agente/produto que reduz o número de bactérias a níveis seguros de acordo com as normas de saúde. Desinfetante é um produto que mata todos os microorganismos patogênicos, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas, em objetos e superfícies inanimadas (BRASIL, 2007a).

Como pode ser observado pelas definições dos produtos com ação antimicrobiana, há uma diferença em reduzir e matar. Segundo Leitão (2001), o objetivo de um programa de sanitização não é esterilizar as superfícies de contato com o alimento e sim reduzir a população microbiana a níveis considerados seguros. Para as superfícies que tocam diretamente o produto, a destruição dos contaminantes deve ser de 99,999% (5 ciclos logarítmicos), após 30 segundos de contato (TOMASINO, 2007).

O programa de desinfecção de áreas e superfícies deverá manter o nível de contaminação dentro dos limites de aceitação, determinados a partir de estudo prévio da escolha adequada do produto, metodologia de uso e da análise dos pontos críticos de contaminação, assim como do histórico das não conformidades. Estas últimas são causadas por questões práticas de aplicação, e não por problemas da técnica ou de efetividade dos produtos escolhidos para o processo de desinfecção (AMARAL; PASCHOAL; ROSSITTO, 2008).

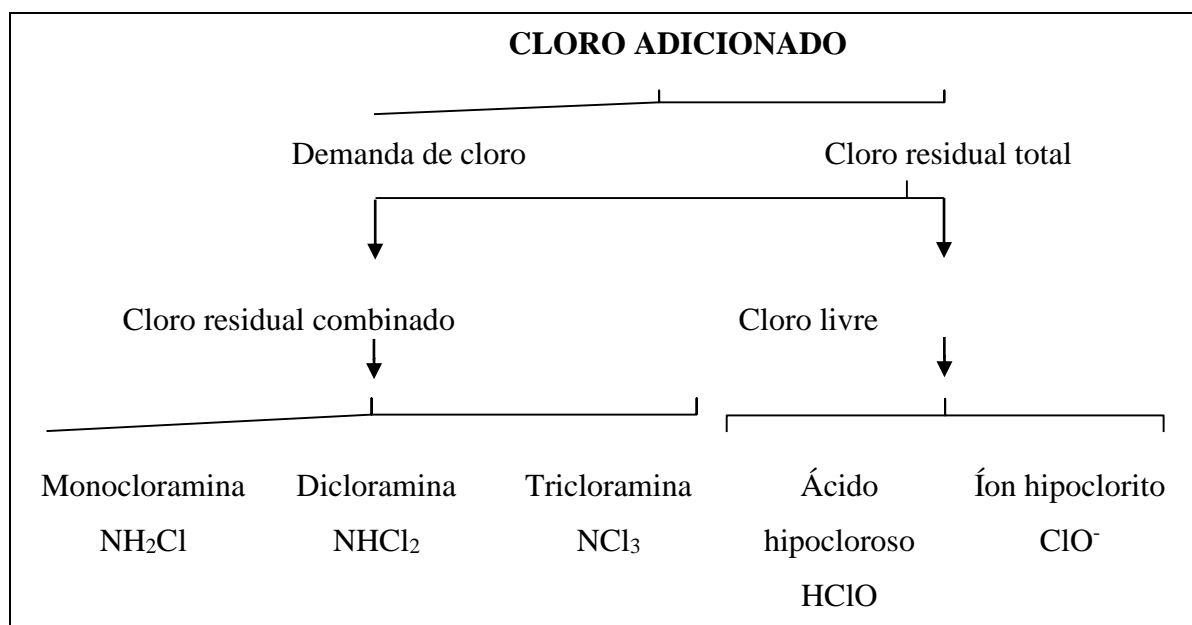
Os produtos sanitizantes domissanitários com ação antimicrobiana são classificados de acordo com sua finalidade e definidos em portarias da ANVISA. Para a indústria de alimentos os princípios ativos autorizados para uso são os compostos inorgânicos e orgânicos liberadores de cloro ativo, as substâncias dos grupos quaternários de amônio e o iodo e derivados (BRASIL, 1988). Posteriormente outra portaria incluiu os compostos do grupo das biguanidas e peróxido de hidrogênio (BRASIL, 1999).

2.2.1 Hipoclorito de sódio

Os sanitizantes à base de cloro são amplamente utilizados nos entrepostos de pescado pela ação antimicrobiana, fácil aplicação e menor custo econômico quando comparados a outros produtos. Podem se apresentar na forma líquida, como o hipoclorito de sódio (NaClO), sólida a exemplo do hipoclorito de cálcio $\text{Ca}(\text{ClO})_2$, ou gasosa como o cloro gasoso (Cl_2) (LEITÃO, 2001).

Segundo Andrade; Pinto e Rosado (2008) subprodutos perigosos como os tri-halometanos formados pela reação com a matéria orgânica na demanda de cloro são considerados cancerígenos, como ocorre com o cloro gasoso e o hipoclorito de sódio. A Figura 1 mostra as reações do cloro na água no processo conhecido como cloração.

Figura 1 – Esquema das reações químicas no processo de cloração da água.



FONTE: Andrade; Pinto e Rosado (2008)

A determinação do cloro livre pode ser feita pelos testes do N, N, dietil-p-fenildiamina (DPD) e orto-toluidina. Esse último está em desuso, sendo substituído pelo DPD, visto que a orto-toluidina é suspeita de causar danos a saúde humana (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008), além de ser um método de menor precisão (NOLL; OLIVEIRA; PESCADOR, 2000).

A 13ª edição do *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* foi a última em que o método orto-toluidina foi citado, pois experimentos realizados entre 64 laboratórios nos EUA concluíram que além da orto-toluidina ser um reagente cancerígeno, o método apresenta erros relativos na ordem de 20,2 % a 42,5 % nas leituras de cloro subestimando os valores reais. Em estudo comparativo dos dois métodos os autores observaram diferenças nas leituras entre 25% – 45%, a menor dos valores reais, quando o cloro é medido pelo método da orto-toluidina. Em conclusão, eles mostraram a desvantagem do uso desse método (NOLL; OLIVEIRA; PESCADOR, 2000).

A concentração de cloro é diferenciada de acordo com o objetivo da sanitização. A água usada no abastecimento interno do Entrepasto de Pescado é hipoclorada usando hipoclorito de sódio (HClO) a uma concentração máxima de 5 mg/L.

As formas inorgânicas do cloro trazem grande preocupação de entidades responsáveis pela segurança dos alimentos. A principal preocupação está associada com a possível captação pelo pescado, de subprodutos resultantes da cloração da água de lavagem, como os trihalometanos e ácidos trihaloacéticos. A cloração é usada mais para reduzir a carga microbiana (higienização) do que como um tratamento de descontaminação. O *Codex Alimentarius* recomenda níveis de 10 mg/L de cloro livre na água que entra em contato direto com o pescado como forma de prevenir a contaminação por patógenos de veiculação hídrica e reduzir a incidência de contaminação cruzada. O nível de cloração da água usada para lavagem de equipamentos, utensílios, piso, paredes, varia de acordo com o grau de contaminação da superfície. Nos locais onde são usados altos níveis de cloro é prática usual da indústria fazer enxague com água potável. É improvável que os consumidores de produtos de pescado estejam expostos a algum risco em decorrência do uso da cloração da água, usada na limpeza e desinfecção, quando boas práticas de fabricação são seguidas (FAO/WHO, 2000).

Normalmente, as soluções de cloro são fornecidas pelo fabricante em concentração de 5 a 15%. Pela ABNT-11833:1991o hipoclorito de sódio deve conter, no mínimo, 10% de cloro ativo em massa, como Cl_2 (ABNT,1991).

2.2.2 Quaternário de amônia

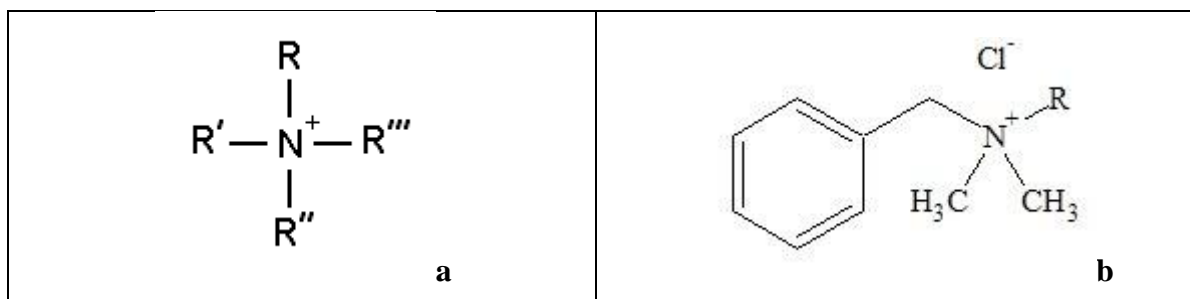
Os compostos de quaternário de amônia são largamente utilizados como antissépticos e desinfetantes devido à sua ação surfactante e à sua baixa toxicidade, aliado ao seu poder microbiocida.

Os compostos do grupo quaternário de amônio são substâncias tensoativas catiônicas que contêm em sua estrutura um átomo de nitrogênio pentavalente, ligado covalentemente a quatro grupos alquila ou arila.

Em solução aquosa essas substâncias se ionizam, produzindo íons orgânicos positivos, os quais são responsáveis pela redução da tensão superficial de líquidos. A Figura 2a mostra a fórmula geral das amônias quaternárias e a 2b, a fórmula do cloreto de benzalcônio (cloreto de lauril-dimetil-benzil amônio), que é um dos compostos mais utilizados como agente de desinfecção com propriedades bactericidas. Segundo a Portaria Nº 15 da ANVISA (BRASIL, 1988), que especifica os compostos de amônia quaternária autorizados para uso

como desinfetantes, os radicais alquila (R) estão compreendidos entre C₈ e C₁₈, sendo mais efetivos os produtos resultantes da combinação C₁₂ – C₁₄.

Figura 2 - Fórmula geral das amônias quaternárias (a) e fórmula estrutural do cloreto de benzalcônio (b).



2.3 Ação dos sanitizantes sobre os micro-organismos

Os quaternários de amônia são substâncias com propriedade germicida, ativos particularmente contra bactérias Gram positivas, mas possuem baixa ação contra Gram negativas. São pouco eficientes contra coliformes e bactérias psicrófilas e ineficientes contra esporos. São usados, normalmente, na sanitização de pisos, paredes, equipamentos (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

O provável mecanismo de ação do quaternário de amônia sobre as bactérias é a interferência nas propriedades de permeabilidade da membrana celular, levando ao extravasamento de metabólitos, interferência no metabolismo de proteínas, causando a desnaturação proteica e a inibição enzimática (ANDRADE *et al.*, 2008; LEITÃO, 2001).

Esses compostos apresentam tolerância moderada na presença de matéria orgânica, são estáveis no armazenamento e eficientes em uma ampla faixa de pH. (LEITÃO, 2001).

Os sanitizantes à base de cloro são amplamente utilizados contra bactérias Gram positivas e negativas e esporos bacterianos. O poder biocida do cloro depende grandemente de sua não dissociação em solução aquosa e está diretamente relacionada ao pH.

Em contato com a água, o cloro se hidrolisa formando ácido hipocloroso (HClO) e íon hipoclorito (ClO⁻), de acordo com a variação do pH. O pH alcalino aumenta a dissociação do ácido hipocloroso, produzindo íon hipoclorito, enquanto, o meio ácido fortalece essa ligação. O conhecimento desse fato é importante porque o ácido hipocloroso e os íons hipoclorito possuem eficiências germicidas muito diferentes. Por essa razão, a desinfecção com cloro é mais eficiente em valores baixo de pH, sendo inferior a 8, o recomendado para desinfecção (MACEDO, 2004).

O ácido hipocloroso é a fração de cloro residual mais ativa como germicida, apresentando-se 80 vezes mais bactericida do que a forma não dissociada. Isto, provavelmente, se deve à semelhança de sua formulação química com a água (H₂O), ao seu baixo peso e tamanho molecular e, principalmente, a ausência de carga elétrica, ao contrário do íon hipoclorito que possui carga negativa. Estas características o fazem possuir elevada capacidade de penetração através da membrana celular e, provavelmente, oxidar os grupos sulfidrilas (-SH) de certas enzimas importantes da via glicolítica, inibindo-as (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008).

A matéria orgânica é também uma variável que pode afetar a eficiência do cloro. A sua presença na água consome o cloro disponível, reduzindo a sua atividade biocida, o que é mais evidente nas soluções com baixos níveis de cloro. De maneira geral, os resíduos de material orgânico ou a barreira física criada por sujidades diversas nas superfícies tratadas retardam ou inviabilizam o processo de desinfecção.

Zhang *et al.* (2009) estudaram a eficácia do hipoclorito de sódio 30 e 50 mg/L na transferência de *Escherichia coli* O157:H7, durante a lavagem simultânea de folhas de alface inoculadas (uma) e não inoculadas (cinco), com e sem matéria orgânica. O desinfetante reduziu, significativamente, a transferência das bactérias nas folhas, porém a adição de 10% de matéria orgânica na água de processamento reduziu a eficácia do agente antimicrobiano. Os autores concluem que é importante compreender o impacto da carga orgânica ao validar a eficácia dos tratamentos antimicrobianos.

2.4 Micro-organismos usados para avaliação da atividade antimicrobiana

Muitas doenças transmitidas por alimentos resultam de práticas impróprias dos manipuladores de alimentos. Se essas pessoas tivessem um maior conhecimento sobre o que causa as enfermidades nos alimentos, talvez as doenças tivessem menos impacto na sociedade, quanto aos aspectos de saúde pública e economia (HISLOP; SHAW, 2009). Huss (1994) relata que as análises microbiológicas não fornecem informações acerca do frescor do pescado, mas permitem detectar a presença de bactérias patogênicas, de micro-organismos indicadores de contaminação fecal ou até de eventuais práticas de manuseio deficientes.

O programa de Redução de Patógenos foi desenvolvido nos Estados Unidos em 1997. Ele surgiu em decorrência do grande número de mortes por um problema conhecido como Doenças de Transmissão Alimentar (DTA), e pela constatação que os programas de garantia de qualidade de alimentos não estavam sendo totalmente eficientes. O programa engloba Análise

de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), controle de *Salmonella* e de *Escherichia coli* e Procedimentos Padronizados de Higiene Operacional (PPHO) (FIGUEIREDO, 2000, MUTH; FAHIMI; KARNS, 2009).

Os padrões microbiológicos da legislação brasileira para pescado e derivados prevêm limites para as bactérias patogênicas causadoras de DTA. Para os crustáceos *in natura* resfriados ou congelados consumidos crus, incluem-se as bactérias *Staphylococcus* coagulase positiva/g e *Salmonella* sp./25 g e coliformes termotolerantes a 45°C para os produtos que sofrem tratamento térmico (BRASIL, 2001).

As bactérias patogênicas causam grandes preocupações quanto ao aspecto sanitário do pescado. A legislação da ANVISA relativa à comprovação da eficiência antimicrobiana de sanitizantes químicos (BRASIL, 2007a), recomenda que os testes incluam *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Salmonella Choleraesuis*.

A bactéria *S.aureus* é a principal representante do grupo das que possuem a enzima coagulase. Está relacionada com sintomas graves de intoxicação sendo o manipulador de alimentos quem abriga a bactéria nas fossas nasais, na garganta, nos cabelos e na pele. A presença de *S. aureus* pode indicar falha no processamento e manuseio impróprio do pescado e a toxina formada é responsável por DTA uma vez que é termorresistente (VIEIRA; TÔRRES, 2004). O controle das enterotoxinas é possível desde que se observem as boas práticas sanitárias de higiene nos estágios de obtenção, produção, estocagem e manuseio de alimentos (CUNHA-NETO; SILVA; STAMFORD, 2002).

Embora *S. aureus* não seja um micro-organismo do ambiente marinho, ele pode ser encontrado em pescado, através da contaminação cruzada entre utensílios e entre alimentos crus e cozidos. Pessoas que trabalham na área de beneficiamento de produtos pesqueiros muitas vezes são responsáveis pela contaminação microbiológica desses alimentos, sem que tenham consciência, na maioria das vezes, do seu papel como veículo de contaminação (EVANGELISTA-BARRETO, 2004).

Evangelista-Barreto e Vieira (2003) isolaram e identificaram cepas de *S. aureus* a partir de amostras das mãos, cavidade nasal, cavidade orofaríngea e saliva dos manipuladores de alimentos, de duas indústrias de pescado em Fortaleza, CE. Foi isolado *S. aureus* em 60 por cento dos indivíduos pesquisados, sendo a área de maior ocorrência a cavidade orofaríngea, seguida da saliva, cavidade nasal e mãos.

Santos *et al.* (2002) detectaram coliformes nos equipamentos e utensílios higienizados e não higienizados em duas linhas de processamento de camarão de uma indústria de pescadom Fortaleza, CE. Foi possível recuperar células viáveis de *Escherichia coli* das

amostras de utensílios higienizados e não higienizados em soluções de até 116 mg/L de cloro livre. As cepas isoladas dos utensílios não higienizados não apresentaram resultados muito diferentes daqueles obtidos para os utensílios higienizados.

Brum (2004) comparou a contaminação das mãos de funcionários de uma indústria de laticínios em Curitiba, antes e após a higienização e observou maior contagem de coliformes a 35°C nas mãos após a lavagem, possivelmente pela ineficiência do sanitizante ou pela contaminação da água. O mesmo autor observou também que durante a realização do trabalho industrial houve aumento nas contaminações por *Enterobacteriaceae*, coliformes a 35°C e *E. coli*, indicando assim a entrada na indústria de funcionários que não higienizaram as mãos ou o fizeram de maneira inadequada e/ou insuficiente, ou ainda uma contaminação cruzada pela má higienização de mesas e utensílios. Oliveira *et al.*(2008) também apresentaram resultados de más condições higiênico-sanitárias das mãos de manipuladores, quando avaliaram cinco estabelecimentos comerciais na cidade de Lavras-MG observando significativo aumento da contagem de micro-organismos deteriorantes e patogênicos.

Cepas de *Salmonella* não tifóide são importantes causas de infecção de origem alimentar reportadas na literatura. Em muitos casos, infecção por *Salmonella* pode estar associada com manifestações extra-intestinal. A complicação mais temida de *Salmonella* é o desenvolvimento de aneurisma micótico, que é um processo infeccioso causado por infecção bacteriana ocorrendo dilatação na parede de um vaso podendo causar ruptura seguida de morte, se não tratado apropriadamente. (CHIU; SU; CHU, 2004). Os aneurismas micóticos causam significativa mortalidade sendo os causados por *Salmonella* de até 60% quando afeta a aorta torácica (SCHNEIDER; KRULLS-MÜNCH; KNÖRIG, 1993). Orts *et al.* (2013) destacam a potencial gravidade e a pouca frequência desse quadro, sendo os casos reportados mais comum em países asiáticos.

2.5 Métodos para comprovação da eficiência antimicrobiana de desinfetantes

Os produtos com ação antimicrobiana para uso na indústria de alimentos, hospitalar ou de uso geral devem comprovar sua eficácia microbiológica para efeito de registro e comercialização mediante as metodologias da AOAC –*Association of Official Analytical Chemists* ou métodos adotados pelo Comitê Europeu de Normatização (CEN).

Na indústria de alimentos eles são destinados à desinfecção de objetos, equipamentos e superfícies inanimadas e ambientes onde se dá o preparo, consumo e estocagem dos gêneros alimentícios (BRASIL, 2007a).

Os testes do MDU da AOAC para atividade bactericida, AOAC 964.02, AOAC 955.14 e AOAC 955.15, têm sido requeridos pela EPA desde 1953, com propósitos regulatórios (COTTRILL; FIUMARA; TOMASINO, 2006; OMIDBAKSH, 2012). Os protocolos europeus descritos pelo teste francês (AFNOR NF T 72-190) e pelo teste alemão DGHM da *German Society for Hygiene and Microbiology* têm a mesma finalidade de registro dos produtos químicos para controle de micro-organismos que possam causar danos à saúde humana (TIMENETSKI, 2002).

No Brasil, foram oficialmente adotadas duas metodologias para avaliação microbiológica de desinfetantes, os métodos qualitativos de diluição de uso (MDU) e o método quantitativo da suspensão, todos padronizados pela AOAC. O Instituto Nacional de Controle e Qualidade em Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) órgão que faz parte do sistema nacional de vigilância sanitária, padronizou e validou o MDU adotado no Procedimento Operacional Padronizado (POP) Nº 65.3210.007 (BRASIL, 2009b).

Há algumas décadas, pesquisadores relatam sobre a falta de padronização internacional para testes de desinfetantes. Os testes variam entre os que usam carreadores como a maioria dos prescritos pela AOAC dos EUA, e os de suspensão microbiana do CEN. Nessas metodologias há diferenças nas espécies microbianas utilizadas nos testes, na forma de carregamento do inóculo e no tempo de exposição microbiana ao desinfetante. É esperado que essas variações de técnicas produzam diferentes resultados, podendo um desinfetante ser qualificado em um país e em outro não (REYBROUCK, 1991; TIMENETSKY, 2002).

São muitos os métodos oficiais da AOAC para exame da atividade desinfetante e suas aplicações abrangem diferentes classes de desinfetantes com ação bactericida, esporicida e fungicida. Ao longo dos anos vários pesquisadores identificaram falhas nesses métodos e muitos deles nunca foram finalizados e outros foram revogados e reiniciados (SPRINGTHORPE; SATTAR, 2005). São, na sua maioria, métodos qualitativos que usam cilindros carreadores de diferentes materiais (aço inoxidável, porcelana, vidro), como suporte do inóculo microbiano, e uma diversidade de espécies testadas contra desinfetantes. O Quadro 2 mostra os métodos da AOAC mais citados nos trabalhos científicos que avaliam a eficiência antimicrobiana de desinfetantes.

Quadro 2 – Métodos Oficiais de Análises para desinfetantes químicos da *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC).

Título do Método	Método AOAC
Método coeficiente fenólico – teste contra <i>Salmonella</i> Typhi	955.11
Método coeficiente fenólico – teste contra <i>Staphylococcus aureus</i>	955.12

Método coeficiente fenólico – teste contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	955.13
Teste da diluição de uso – contra <i>Salmonella Choleraesuis</i>	955.14
Teste da diluição de uso – contra <i>Staphylococcus aureus</i>	955.15
Teste da diluição de uso – contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	964.02
Atividade fungicida de desinfetante usando <i>Tricophyton mentagrophytes</i>	955.17
Atividade esporicida de desinfetante	966.04
Teste da suspensão - desinfetantes com ação sanitizante germicida e detergente	960.09

Fonte: SPRINGTHORPE; SATTAR (2005).

Por muitas décadas vêm sendo desenvolvidas pesquisas indicando falhas nos procedimentos para avaliação de desinfetantes que causam uma grande variabilidade dos resultados dos testes inter e entre laboratórios.

Mota e Albuquerque (1975) propuseram uma técnica para avaliação sumária da atividade dos desinfetantes usados na área de saúde, visto que a inexistência de uma legislação apropriada permitia ao comércio brasileiro o lançamento de uma enorme variedade de produtos rotulados como desinfetantes ou esterilizantes os quais quando testados na prática não alcançavam os objetivos desejados. À época já estava sendo difundido o teste do coeficiente fenólico e o da diluição de uso.

O teste de coeficiente fenólico (AOAC 955.11) foi um dos primeiros testes executados para avaliação de desinfetantes. Este teste foi finalizado em 1964 e foi inicialmente testado contra a bactéria *Salmonella Typhi* ATCC 6539, patógeno de grande importância epidemiológica. Com o passar dos anos, a metodologia recebeu várias propostas de modificação permanecendo o fundamento básico de comparação da eficiência do sanitizante com uma solução padrão de fenol e a inclusão das culturas-teste de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (AOAC 955.12) e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 (AOAC 955.13). A metodologia mostrou limitações quanto à precisão, sendo necessária a confirmação das diluições de uso do sanitizante avaliado com outros testes, além de ser pouco reprodutível (ANDRADE; CARELLI; MARTINS, 2008; SPRINGTHORPE; SATTAR, 2005; TIMENETSKY; ALTERTHUM, 1989).

Timenetsky e Alterthum (1989) analisaram os coeficientes fenólicos (CF) de 24 desinfetantes de uso hospitalar e/ou doméstico pelos métodos do coeficiente fenólico da AOAC com modificações, tendo como pressuposto que um alto valor de CF para um determinado desinfetante não representaria, necessariamente, uma melhor eficácia quando comparado com outros de menor CF. A diluição de uso do produto recomendada é importante para possibilitar a comparação da ação desinfetante. Os autores concluíram que os produtos desinfetantes

analisados apresentaram CF diferentes, mas mesmo assim, não poderiam ser comparados quanto à sua eficácia germicida. Timenetsky (2002) ratificou essa conclusão comparando os CF do álcool (0,24) e do fenol (1,0). Os valores poderiam levar a conclusão de que o álcool quando diluído em água tem desempenho bactericida inferior ao do fenol, no entanto significa que ele não permite a mesma diluição em água que o fenol para causar o mesmo efeito.

2.5.1 Método da diluição de uso da AOAC (INCQS/POP Nº 65.3210.007)

O método de diluição de uso (MDU) é um teste amplamente aceito, reconhecido como rigoroso e bem padronizado e tem como principais objetivos determinar a maior diluição do sanitizante que ainda apresenta eficiência bactericida e avaliar as concentrações recomendadas pelos fabricantes (ANDRADE; CARELLI; MARTINS, 2008).

Os testes do MDU da AOAC são avaliados com três espécies bacterianas, *Salmonella Choleraesuis* (AOAC 955.14); *Staphylococcus aureus* (AOAC 955.15), e *Pseudomonas aeruginosa* (AOAC 964.02).

O POP Nº65.3210.007 do INCQS descreve o MDU e reúne no mesmo teste as três bactérias sendo *P. aeruginosa* substituída por *Escherichia coli* ATCC 11229, quando a análise for aplicada para desinfetantes usados em indústrias alimentícias. Essas bactérias *Staphylococcus* coagulase positiva/g, coliformes termotolerantes a 45°C/g e pesquisa de *Salmonella* sp. em 25g constam na RDC Nº 12 (BRASIL, 2001) por serem patógenos com grande possibilidade de presença e desenvolvimento nos alimentos e em manipuladores, caso as condições higiênicas não sejam adequadas.

O MDU consiste em contaminar por submersão 60 cilindros (carreadores) de aço inoxidável, padronizados e esterilizados com cada uma das suspensões das bactérias teste e submetê-los à ação da solução de uso do desinfetante por 10 minutos. A resposta da eficiência antimicrobiana é baseada na destruição dos micro-organismos teste em 59 dos 60 cilindros, confirmada pela ausência de turvação do meio de subcultivo (BRASIL, 2009).

Esse método é reconhecido como trabalhoso, sensível para o operador e requer laboratório e pessoal treinado para cumprir a metodologia (TIMENETSKY, 2002). Um aspecto que exemplifica esses atributos ao teste assemelha-se ao que ocorre com o teste para atividade esporicida AOAC 966.04 aplicado por Miner *et al.* (1997) para verificarem a atividade esporicida de bactérias. Carreadores com bactérias teste são manualmente colocados em tubos de ensaio de 25 mm x 150 mm contendo 10 mL de desinfetante. Se um cilindro ou a alça transportadora, acidentalmente, contaminar as paredes do tubo, durante essa etapa, o cilindro

estéril pode ser recontaminado durante a sua retirada do desinfetante teste. A presença de mais de um cilindro não estéril no total de 240 (para quatro cepas padrão) conduz à falha do teste e dificulta determinar se o carreador contaminado foi devido a uma falha verdadeira ou a um acidente técnico.

Reduções no número de carreadores empregados no MDU foram propostas por pesquisadores, o que tornaria mais prática a execução da metodologia. Andrade, Carelli e Martins (2008) sugeriram, como adaptação desse teste para a indústria de alimentos, o uso de 10 cilindros. O POPN^o65.3210.007 do INCQS indica o uso de 60 cilindros no ensaio para as três cepas padrão podendo em uma avaliação preliminar empregar 10 cilindros por cepa. Timenetsky (1990) analisou as propriedades antimicrobianas de cinco desinfetantes químicos de uso doméstico comparando o método qualitativo MDU padronizado pela AOAC, para efeito de triagem, com 10 carreadores inoculados separadamente, e adaptou o mesmo método inoculando todos os dez cilindros em frascos Erlenmeyer com 100 mL de meio de subcultivo. Concluiu que os dez carreadores subcultivados, conjuntamente, não alterava os resultados em relação ao método padronizado para efeito de triagem.

Muitas deficiências têm sido identificadas nos métodos da AOAC para verificar atividades de desinfetantes químicos sobre superfícies hospitalares e ambientais (SPRINGTHORPE; SATTAR, 2005). Um maior número de questionamentos tem sido sobre a grande variabilidade de resultados entre laboratórios que desenvolvem as metodologias padronizadas. Pesquisas têm sido conduzidas para identificar etapas críticas dos métodos que possam causar as variações e algumas modificações têm sido propostas.

Segundo Cole, Rutala e Carson (1987), duas possíveis falhas nos MDU da AOAC são as diferenças entre marca e materiais usados nos cilindros e a variabilidade do número de micro-organismos fixados sobre as superfícies dos carreadores. Foi observada uma variação considerável na lisura das superfícies internas e externas dos cilindros de aço inoxidável, de porcelana (usado para teste esporicida) e de vidro. O número de bactérias padrão (*Salmonella Choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) recomendado pelo método teve diferentes graus de adesão para os três diferentes materiais. Alfano, Cole e Rutala (1988) testaram as mesmas bactérias padrão usando o MDU e também verificaram grau de adesão diferenciado quando introduziram uma etapa de lavagem dos cilindros de aço inoxidável com solução tampão fosfato para recuperar as células viáveis das bactérias. A variabilidade do número de células viáveis recuperadas no meio de crescimento entre as três bactérias, devido ao desprendimento de células dos cilindros, pode ser um factor significativo na variabilidade do MDU

Cole, Rutala e Samsa (1988) em um estudo inicial, encontraram uma extrema variabilidade nos resultados dos testes do MDU ao avaliarem desinfetantes hospitalares idênticos em 18 laboratórios. Um segundo estudo com modificações no método para determinar se a variabilidade dos resultados dos testes interlaboratoriais seria reduzida para um nível aceitável como MDU modificado. Os resultados mostraram que a variação entre laboratórios não foi significativamente reduzida para nenhum dos três micro-organismos teste (*Salmonella Choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*) de modo que os autores questionaram o uso do MDU, original ou modificado, para fins de registro.

O POP Nº 65.3210.007 do INCQS é bastante rigoroso nas recomendações do uso dos cilindros carreadores para o MDU. A metodologia determina marcas específicas de fabricantes, material, dimensões, cuidados no preparo e forma de conduzir a triagem para a utilização dos cilindros nos ensaios. A dificuldade na obtenção de fornecedores e da manutenção da integridade desse material poderá levar alguns laboratórios a elaborarem os próprios cilindros, baseados nas especificações descritas.

Um estudo colaborativo envolvendo 18 laboratórios que realizam rotineiramente o MDU foi realizado para avaliar o grau de variabilidade dos resultados dos testes de eficácia de desinfecção. Foram testadas amostras idênticas de seis desinfetantes (três fenólicos e três quaternários de amônia) para uso hospitalar registrados na EPA. Os resultados de aprovação foram: 80% contra *Salmonella Choleraesuis* ATCC 10708, 66% contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e 38% contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Estes resultados mostraram a incapacidade de se reproduzir as recomendações bactericidas realçadas pelos fabricantes nos rótulos dos desinfetantes contra as três bactérias testadas (RUTALA; COLE, 1987).

Tomasino (2005) e Tomasino e Hamilton (2006) conduziram estudos para colaborar na modificação oficial do método AOAC 966.04, referente à avaliação esporicida de desinfetantes, com o objetivo de eliminar e/ou reduzir a variabilidade associada com etapas importantes da metodologia. Dentre outros parâmetros investigados, esses autores sugeriram uma etapa no procedimento capaz de possibilitar a quantificação da população microbiana do inóculo por carreador que entre em contato com o desinfetante, propondo um limite mínimo de 2×10^5 e um máximo de 1×10^6 esporos por carreador. A proposta de logaritmizar os dados da contagem microbiana seria para estimar a redução logarítmica do controle e comparar com a resposta qualitativa do teste.

Corroborando com os estudos conduzidos sobre enumeração da população microbiana nos carreadores usados nos MDU, Tomasino, Fiumara e Cottril (2006) compilaram e analisaram 78 testes conduzidos pelo Laboratório de Microbiologia dos Programas Oficiais

de Pesticida durante seis anos, investigando os métodos (AOAC 955.15 e AOAC 964.02). O logaritmo da contagem média dos carreadores foi 6,6 ($4,0 \times 10^6$ UFC/carreador) e 95% dos valores médios mostraram repetibilidade. Concluíram que o procedimento para enumeração e contagem da população microbiana dos carreadores aumenta a reprodutibilidade dos MDU e melhora a qualidade dos dados.

Arlea *et al.* (2008) também conduziram pesquisa com o MDU testando desinfetante à base de quaternário de amônia contra *Pseudomonas aeruginosa*. Os autores relataram que esse teste tem sido bastante criticado devido a extrema variabilidade dos resultados, que foi significativamente minimizada pela inclusão de uma etapa de diluição do inóculo. Participaram da pesquisa quatro laboratórios envolvendo mais de 6015 carreadores.

Reybrouck (1992) questionou em que medida o valor de uma preparação para a desinfecção de superfícies pode ser previsto com os testes usuais *in vitro*, na qual o desinfetante é diluído em água destilada, esterilizada, com a dureza corrigida ou adicionado de uma solução de 0,2% de albumina, imitando a presença de matéria orgânica. Testes práticos são, portanto, necessários para a avaliação dos desinfetantes de superfície, não sendo suficientes, *per si*, os testes desenvolvidos com protocolos laboratoriais.

Nos estudos colaborativos desenvolvidos por pesquisadores, há décadas, observa-se a tendência das propostas de modificações nos MDU, pelas constatações da variabilidade nos resultados em suas aplicações. OMIDBAKSH (2012) conduziu estudo do MDU, do ponto de vista estatístico, avaliando a probabilidade do resultado aprovar ou falhar e questiona o uso desse método como propósito de registro de desinfetantes com ação antimicrobiana. Recomenda que o uso desses métodos para esse objetivo seja extinto, o mais rapidamente possível, e melhores métodos sejam adotados como os usados no Canadá e Austrália.

Foram revisados e aprovados em julho de 2012 os métodos AOAC 955.14 (*Salmonella Choleraesuis*); AOAC 955.15 (*Staphylococcus aureus*); AOAC 964.02 (*Pseudomonas aeruginosa*) e em outubro de 2011 o método AOAC 960.09 (Teste da Suspensão - Desinfetantes com ação de sanitizante germicida e detergente) pelo comitê dos métodos do teste de eficácia antimicrobiana, para refletirem mudanças (editorial e revisões dos procedimentos) para a 19ª edição (LATIMER, 2012) do *Official Methods of Analysis – AOAC*.

2.5.2 Método da Suspensão (AOAC 960.09)

O método da suspensão (AOAC 960.09) avalia a eficiência de sanitizantes químicos através da redução de uma população microbiana em suspensão. É recomendado pela AOAC

para avaliar sanitizantes empregados em superfícies não porosas, previamente limpas, que entram em contato com os alimentos (ANDRADE; CARELLI; MARTINS, 2008).

Os testes desse método são mais simples, menos trabalhosos e mais baratos do que os MDU da AOAC (SILVA *et al.*, 2003). Neste método uma suspensão bacteriana, de população conhecida, é adicionada à solução desinfetante permanecendo 30 s e após a exposição verifica-se, através de meio de crescimento, se o inóculo foi morto ou reduzido. É um método quantitativo em que o número de micro-organismos sobreviventes é contado (Contagem Padrão em Placas) e comparado com o número da população inicial. As cepas padrão empregadas para avaliação da atividade antimicrobiana são *Staphylococcus aureus* ATCC N^o 6538 e *Escherichia coli* ATCC N^o 11229.

Os resultados dos testes são apresentados na forma de Reduções Decimais (RD) na população das duas bactérias teste, levando em conta o tempo de exposição (30 s) e a concentração do sanitizante. A RD é a diferença entre o logaritmo decimal do total de micro-organismos na suspensão bacteriana inicial e o logaritmo decimal da população sobrevivente ($RD = \log N_i - N_f$). O critério de aprovação do teste é quando a RD é maior ou igual a 5 que corresponde a uma redução de 5 ciclos logarítmicos. O Quadro 3 mostra um exemplo de um resultado de aprovação do teste utilizando um desinfetante clorado 100 mg/L de cloro residual total (CRT). (ANDRADE; CARELLI; MARTINS, 2008). O logaritmo da população inicial (2×10^9) é 9,30 e da população final (2×10^4) é 4,30, portanto houve uma RD igual a 5.

Quadro 3 – Exemplo de um resultado da avaliação de um desinfetante utilizando-se o Método da suspensão.

Produto clorado	100 mg/L CRT, pH 9,5
Micro-organismo	<i>Escherichia coli</i>
Número inicial do inóculo	2×10^9 UFC/mL
Número de sobreviventes	2×10^4 UFC/mL
% redução	99,999
RD	5,0
Conclusão	Sanitizante aprovado

Fonte: ANDRADE; CARELLI; MARTINS(2008).

2.6 Substâncias neutralizantes da ação dos desinfetantes

A neutralização dos ingredientes ativos de desinfetantes é uma das mais importantes etapas nos testes de eficácia antimicrobiana, assim como a segurança da ineficácia bacteriostática do próprio neutralizante ou de sua interação com o desinfetante, contra as bactérias teste (TOMASINO; HAMILTON, 2006).

O uso de substâncias neutralizantes é considerado fundamental, principalmente, para o método (AOAC 960.09), considerando que a quantidade de desinfetante incorporada ao meio de cultivo é maior que no MDU. Essas substâncias têm o objetivo de cessar ou neutralizar o efeito do sanitizante após o tempo de contato com o micro-organismo teste, não permitindo dessa forma, que continue a sua ação no meio de cultura (ANDRADE; CARELLI; MARTINS, 2008; OKAZAKI, 2003). Dependendo do princípio ativo do desinfetante testado há uma recomendação de uso do neutralizante adequado, como mostra o Quadro 4.

Quadro 4 – Substâncias neutralizantes para uso em desinfetantes de acordo com o princípio ativo.

Princípio ativo do desinfetante	Neutralizante
Compostos inorgânicos ou orgânicos liberadores de cloro; Compostos iodados	Tiosulfato de sódio
Compostos tensoativos catiônicos (quaternários de amônia); Clorohexidina	Lecitina + Polissorbato 80 (Tween 80)
Composto fenólico	Polissorbato 80 (Tween 80)
Aldeído	Sulfito de sódio

Fonte: BRASIL, 2009b.

A neutralização pode envolver uma reação química simples, quando se usa, por exemplo, tiosulfato de sódio para controle da ação de compostos clorados ou iodados, ou complexa quando uma mistura de substâncias neutralizantes entra em contato com partes lipofílicas dos sanitizantes, inativando-os (ANDRADE; CARELLI; MARTINS, 2008).

O caldo nutritivo Lethen (Difco) associa o meio de cultivo e a mistura dos neutralizantes lecitina de ovo e Tween 80, sendo indicado no MDU (INCQS/POP Nº65.3210.007) quando se testa desinfetantes à base de quaternário de amônia (BRASIL, 2009b).

No MDU a forma de exposição dos micro-organismos ao desinfetante é através de um cilindro contaminado e seco antes da incubação em meio de cultivo com o neutralizante,

para detecção dos sobreviventes. Nesse caso, a quantidade de desinfetante carregada é mínima, podendo ser usada uma pequena quantidade de neutralizante. A etapa de neutralização é mais crítica no método da suspensão pela maior quantidade retirada do inóculo suspenso no desinfetante, que entra em contato com o neutralizante (OKAZAKI, 2003). Nesse método o procedimento de neutralização está padronizado somente para compostos de amônio quaternário, em concentrações menores ou iguais a 200 mg/L (TOMASINO, 2007).

A diluição e a neutralização química, normalmente, são as técnicas mais usadas para inativar o efeito tardio de desinfetantes, podendo ser usadas conjuntamente ou individualmente. Outra forma usada é a lavagem das células microbianas, consistindo na inativação física dos sanitizantes por meio de centrifugação ou filtração em membrana. Os filtros de ésteres de celulose com porosidade 0,45 µm permitem a retenção das células microbianas na membrana filtrante e o emprego de fluido de lavagem adequado é requerido para a eliminação de resíduo de agentes antimicrobianos (ANDRADE; CARELLI; MARTINS, 2008).

Okazaki (2003) adaptou o método de suspensão para determinação da atividade bactericida de desinfetantes à base de cloreto de benzalcônio em concentrações acima de 200mg/L, substituindo a neutralização por filtração com subsequente enxágue das membranas com neutralizante (0,2% de lecitina + 1,5% de tween 80) ou com tampão fosfato. A autora verificou que os dois modos de enxágue foram suficientes para eliminação dos microorganismos testados.

2.7 Gabinete de higienização dos manipuladores nos Entrepostos de pescado

Gabinete de higienização é o local, de passagem obrigatório para a área limpa do recinto industrial, onde é realizada a higienização das botas e das mãos dos manipuladores. Entende-se por área limpa o local destinado à execução das etapas tecnológicas do fluxograma do produto a ser elaborado, a partir do recebimento da matéria- prima já lavada (BRASIL, 2007b).

Os manipuladores ao entrarem na área de higienização seguem protocolos determinados pela indústria para a lavagem e sanitização das mãos e das botas utilizando água

corrente clorada, detergente antisséptico, papel toalha descartável, escova e sanitizantes químicos.

Os gabinetes de higienização dos entrepostos de pescado cearenses são muito semelhantes com relação aos equipamentos disponíveis para a higiene dos manipuladores, pois são instalados para cumprirem o mesmo objetivo. Diferem em alguns pontos como área, forma de acionamento das torneiras dos lavatórios das mãos, localização do pedilúvio, tipo de lava botas (manual ou automático) e capacidade de higienização simultânea de manipuladores.

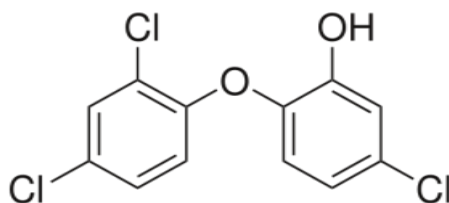
As pessoas são partes muito importantes em um programa de higienização nos entrepostos de pescado. São elas que estabelecem, seguem e também quebram as regras de saneamento, determinadas pela vontade e esforço pessoal. O cumprimento das regras de higiene previstas na legislação, a preparação das soluções e o uso correto dos sanitizantes químicos aprovados pela ANVISA (BRASIL, 2007b) são realizados por pessoas que muitas vezes ignoram a importância da limpeza e sanitização em um entreposto de pescado bem como a relação custo-benefício, visto que os resultados desta atividade não são economicamente de fácil mensuração (SOUSA *et al.*, 2011).

2.8 Higienização das mãos e botas dos manipuladores no entreposto de pescado

As mãos constituem a principal via de transmissão de micro-organismos patogênicos ou não, que podem ser transferidos de uma superfície para outra, por meio de contato direto ou indireto através de objetos e/ou superfícies contaminadas. A lavagem das mãos com água e sabão tem a finalidade de remover as bactérias que colonizam as camadas superficiais da pele tais como *Escherichia coli*, assim como outras sujidades que contribuem para a permanência e a proliferação dos micro-organismos. O ato de lavar as mãos é simples, individual e quando realizado adequadamente tem grande eficácia para reduzir a chance de contaminação do alimento com micro-organismos. Lucet *et al.* (2002) citam que o procedimento da técnica correta, particularmente com relação à duração, não é frequentemente praticado.

A higienização das mãos dos manipuladores no entreposto de pescado em estudo inicia com a lavagem com água e sabonete bactericida (Diversey Jonhson) cujo princípio ativo é o triclosan (Figura 3). Esta substância é efetiva contra bactérias Gram negativas e positivas e está presente na formulação em baixa concentração (0,5%).

Figura 3 – Fórmula estrutural do triclosan (éter 2,4,4 triclora hidroxidifenílico).



O sabonete possui formulação rica em substâncias tensoativas e pH entre 7,0 – 8,0, característica que confere boa tolerância para uso na pele. Os tensoativos são conhecidos também como surfactantes ou emulsificantes visto que diminuem a tensão superficial em interfaces líquido-líquido, líquido-gás ou sólido-líquido. Essa propriedade está relacionada com a constituição da molécula que apresenta grupos polares (hidrofílicos) e apolares (hidrofóbicos). A higiene das mãos é complementada com o gel higienizador (Ecolab Química Ltda.) a base de álcool. A fricção das mãos com o uso de álcool gel tem a finalidade de reduzir a carga microbiana das mãos (não há remoção de sujidades) remanescente da lavagem, dessa forma é uma etapa que complementa a outra.

As substâncias antissépticas (sabão bactericida e álcool gel) empregadas na higienização das mãos dos manipuladores estão fora do alcance do Regulamento da ANVISA que compreende os produtos com ação antimicrobiana, destinados ao uso em objetos, sobre superfícies inanimadas e em ambientes (BRASIL, 2007a).

O beneficiamento de pescado nos entrepostos cearenses é muito semelhante quanto à elaboração de produtos frescos ou congelados, crus ou cozidos, consistindo em trabalho essencialmente manual, fato que justifica um maior esforço no cumprimento das normas higiênicas implantadas para redução da carga microbiana das mãos e das botas dos manipuladores.

Muitas pesquisas demonstraram a participação dos manipuladores nas avaliações das condições higiênicas de estabelecimentos de alimentos que pelo contato direto e por apresentarem condição inadequada de higiene podem ser transmissores de DTA. A avaliação microbiológica de mãos, luvas e unhas são alvos de investigações em diferentes pesquisas e em diferentes locais, inclusive em ambientes da área de saúde (ALMEIDA *et al.*, 1995; ANDRADE; SILVA; BRABES, 2003; CARELLI *et al.*, 2003; LUCET *et al.*, 2002; SOUSA *et al.*, 2011; POERNER *et al.*, 2009; VARGAS; QUINTAES, 2003).

Almeida *et al.* (1995) procederam uma pesquisa microbiológica com manipuladores de alimentos e atribuíram ao nível educacional relativamente baixo dos operários o aparecimento de toxinfecções alimentares associadas aos serviços de alimentação. Souza *et al.*

(2011) consideraram que a não aplicação correta dos PPHO de uma indústria de pescado, localizada em São João de Pirabas-PA foi responsável pela baixa qualidade microbiológica das mãos dos manipuladores.

Vieira *et al.* (2000) analisaram a influência das condições higiênico-sanitárias no processo de beneficiamento de tilápias *Oreochromis niloticus* em filés congelados, produzidos em um frigorífico de uma fazenda de criação de peixes, situada em Campina Grande-PB . Os resultados evidenciaram falhas higiênicas por parte dos manipuladores na indústria, necessitando de melhorias em todo o processamento, principalmente, na filetagem e retirada da pele, etapas nas quais as amostras se apresentaram mais contaminadas por *Staphylococcus aureus*.

A bactéria *E. coli* é a principal representante do grupo das coliformes termotolerantes e são causadoras de doenças entéricas. Todd *et al.* (2009) descreveram o papel dos manipuladores de alimentos relacionado a DTA. Patógenos na área da preparação de alimentos podem ser originados de trabalhadores infectados, que contaminam alimentos, superfície de contato com alimentos ou outros manipuladores. A mais frequente contaminação pelo manipulador é a rota fecal-oral e estudos têm indicado que a toailete com papel pode não ser suficiente para impedir a transmissão de patógenos pelas mãos.

Na mesma linha de investigação a literatura cita pesquisas das condições higiênicas das mãos de trabalhadores da área da saúde. Lucet *et al.*(2002) conduziram trabalhos em unidades de tratamento intensivo de um hospital, baseados em observações sobre a transmissão de patógenos entre pessoas, que ocorre nesses ambientes. As análises microbiológicas foram usadas para verificação da eficácia de antissépticos antes, e depois de diferentes técnicas de higiene das mãos.

Assim como ocorre com as mãos, a lavagem e a sanitização das botas é realizada pelos manipuladores no gabinete de higienização.Os calçados de borracha, próprios para o trabalho em indústrias molhadas como os entrepostos de pescadorequerem cuidados de higienização, pois constituem potenciais veículos no transporte de patógenos para o piso da área de processamento.

A limpeza é iniciada pela lavagem manual, feita em lavador coletivo, com número variável de torneiras com acionamento por pedal para a saída da água e com as respectivas escovas de cabo longo para fricção do sabonete líquido. Em seguida os operários atravessam o pedilúvio contendo solução de quaternário de amônia com o objetivo de desinfecção de botas.

Originalmente, a palavra pedilúvio significa o local apropriado para lavar pés humanos ou patas animais. Nos entrepostos de pescado essa denominação é relativa a um local

de piso rebaixado normalmente retangular, localizado no gabinete de higienização próximo à entrada da área de produção.

Todos os entrepostos de pescado do Estado do Ceará usam nos pedilúvios produtos comerciais tendo como princípio ativo quaternário de amônia (SFA, 2012).

Poucos entrepostos cearenses possuem lavadores de botas automáticos, cuja limpeza é feita por escovas rotativas cilíndricas que permitem lavar completamente as botas, incluindo sola, superfície superior e cano. Nesse caso, as escovas da máquina são dispostas de modo a permitir o contato com as laterais e com a sola das botas do manipulador.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local do trabalho

As amostras para a realização deste estudo foram provenientes de um Entrepósito de Pescado com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), localizado na cidade de Fortaleza-CE. É um estabelecimento habilitado para exportação e tem implantados os programas Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) e seus pré-requisitos Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO).

Os testes de eficácia antimicrobiana dos desinfetantes e a avaliação microbiológica dos processos de higienização dos manipuladores e da matéria-prima foram realizados no Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado, do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará.

3.2 Definição das soluções dos desinfetantes usadas

Foi feita uma avaliação preliminar sobre os sanitizantes usados na no Entrepósito de pescado através de consulta da ficha técnica e certificados de compra, de entrevista com pessoas responsáveis pelo setor, da identificação do local de uso dentro da planta industrial, do modo de preparo das soluções sanitizantes e do acompanhamento dos procedimentos de higienização pessoal e ambiental.

Essas observações permitiram eleger os sanitizantes avaliados neste trabalho e ajudaram a definir as concentrações das soluções para avaliação da eficiência microbiológica dos desinfetantes e os pontos de coleta das amostras da matéria-prima e das mãos e botas dos manipuladores.

O Entrepósito de pescado faz o monitoramento do teor de cloro residual livre na água de abastecimento (máximo 5mg/L) utilizando o teste de ortotoluidina (2-amino-1-metilbenzeno) de 5 segundos, cuja leitura é feita em uma escala padrão de cores do cloro residual livre, numa frequência de quatro vezes ao dia colhendo amostras das seções: recepção da matéria prima, salão de beneficiamento e na fábrica de gelo. Simultaneamente, é feita a leitura do pH no mesmo “kit” por comparação de cores. Verificou-se durante seis meses (maio a outubro/2012), em registros da indústria, valores de pH entre 7,4 (mínimo) a 8,2 (máximo), tendo a média se mantido em 7,6.

O valor de Cloro Residual Livre do hipoclorito de sódio declarado pelo fornecedor serve de base para a indústria preparar as soluções, durante o tempo de duração do estoque, que segundo a informação do encarregado de compra é aproximadamente trinta dias, armazenado a temperatura ambiente.

Foram coletadas cinco amostras de hipoclorito de sódio no entreposto de pescado e analisados o teor de cloro residual livre (CRL) e os valores de pH no Laboratório de Química do Núcleo de Tecnologia do Ceará (NUTEC), sendo o CRL determinado pelo método iodométrico (ABNT, 1991) e o pH em potenciômetro modelo m PA-210, TecnoPON.

As concentrações das soluções de hipoclorito de sódio foram preparadas de acordo com aquelas usadas na indústria: 5mg/L (água de lavagem da matéria prima recebida, fabricação de gelo e de uso no salão de beneficiamento); 100 mg/L e 200 mg/L (desinfecção de pisos, superfície de paredes, equipamentos e utensílios).

Outro sanitizante utilizado no Entreposto de Pescado é o Cloreto de Benzalcônio (cloreto de alquil-dimetil-benzil amônio), um composto a base de quaternário de amônio. É usado no pedilúvio localizado no gabinete de higienização e nas tesouras e escovas utilizadas na etapa de evisceração das caudas de lagostas. O produto comercial é adquirido em embalagens plásticas de 25 litros e as substâncias do princípio ativo e as suas concentrações podem variar de acordo com o fabricante.

Foi determinada a concentração de uso do cloreto de benzalcônio no pedilúvio usando a equação 1. Os dados V_1 , V_2 e C_1 foram obtidos, respectivamente, medindo o volume do pedilúvio, pela informação sobre o volume do sanitizante adicionado nesse local e pela concentração do princípio ativo declarado na embalagem. As soluções usadas para análise da eficiência antimicrobiana do cloreto de benzalcônio foram 77 mg/L e 10.000 mg/L (1%) que representam respectivamente, a preparada na indústria e a recomendada pelo fabricante.

$$\text{Equação 1: } C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

C_1 = concentração do sanitizante

V_1 = volume usado do sanitizante,

C_2 = concentração da solução

V_2 = volume da solução.

3.3 Métodos utilizados para verificação da eficiência antimicrobiana das soluções desinfetantes.

3.3.1 Método da Diluição de Uso (INCQS/ POP N° 65.3210.007)

As soluções desinfetantes foram avaliadas pelo Procedimento Operacional Padronizado (POP) N° 65.3210.007 do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz (INCQS/FIOCRUZ) (BRASIL, 2009b).

3.3.1.1 Soluções desinfetantes

As soluções de hipoclorito de sódio e quaternário de amônia nas concentrações de 5, 100 e 200 mg/L e 77 e 10.000 mg/L, respectivamente, foram preparadas uma hora antes do início do experimento, usando água destilada, esterilizada em autoclave a 121°C por 20 min., cujo pH médio foi 8,97.

O MDU foi aplicado para a água sanitária de uso domiciliar com teor de cloro ativo declarado 2,0 a 2,5%, dentro do prazo de validade e com recomendação de uso pura para desinfecção de ralos e vasos sanitários, com o objetivo de testar o método para alta concentração de cloro ativo.

3.3.1.2 Micro-organismos teste

Foram usadas as bactérias *Staphylococcus aureus* INCQS N° 00039 (ATCC 6538), *Salmonella Choleraesuis* INCQS N° 00028 (ATCC 10708) e *Escherichia coli* INCQS N° 00032 (ATCC 11229) recomendadas na metodologia para uso dos desinfetantes em indústria alimentícias. As cepas padrão foram provenientes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

3.3.1.3 Preparo dos cilindros carreadores

Foram utilizados cilindros de aço inoxidável tipo 304, polidos, medindo 10 mm de comprimento e 8 mm e 7,5 mm de diâmetros externo e interno, respectivamente. Foi feita uma triagem dos cilindros selecionando-se aqueles sem danos aparentes. Antes do uso foram fervidos em água durante 10 minutos, imersos em solução de hidróxido de sódio 1M por 12

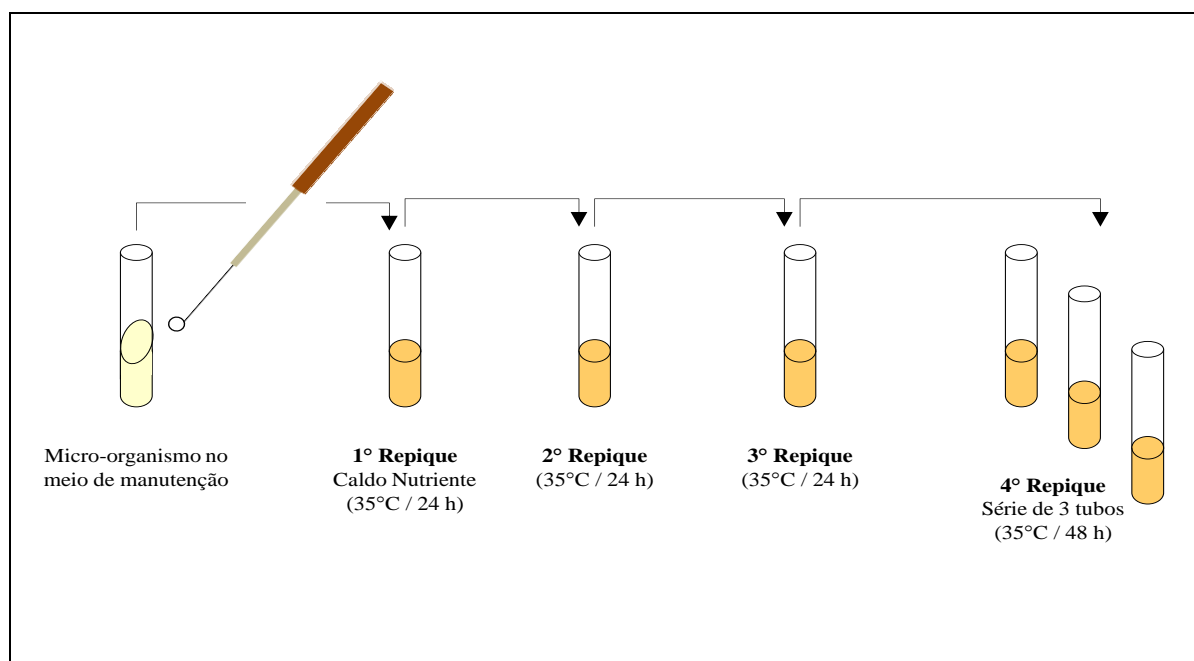
horas, lavados abundantemente com água destilada e colocados em tubos de vidro rosqueados, em autoclave a 121°C por 20 minutos.

Os controles recomendados na metodologia do MDU foram executados com relação à viabilidade e a esterilidade do meio de cultura, esterilidade da água destilada, das pipetas e dos cilindros carreadores.

3.3.1.4 Preparo do inóculo

As suspensões bacterianas de cada uma das culturas teste *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Choleraesuis* e *Escherichia coli* foram preparadas a partir das culturas liofilizadas conforme recomendação da metodologia. A cultura estoque foi mantida em ágar nutriente (Difco) inclinado, em temperatura de 20°C. Para sua ativação foram feitos três repiques sucessivos de 24 h e incubados a 35°C ±1°C em caldo nutriente (Difco). No quarto repique de 48 h foram preparados três tubos com a suspensão bacteriana (Figura 4).

Figura 4 - Preparo do inóculo da cultura teste para o método da diluição de uso (INCQS/POP N° 65.3210.007).



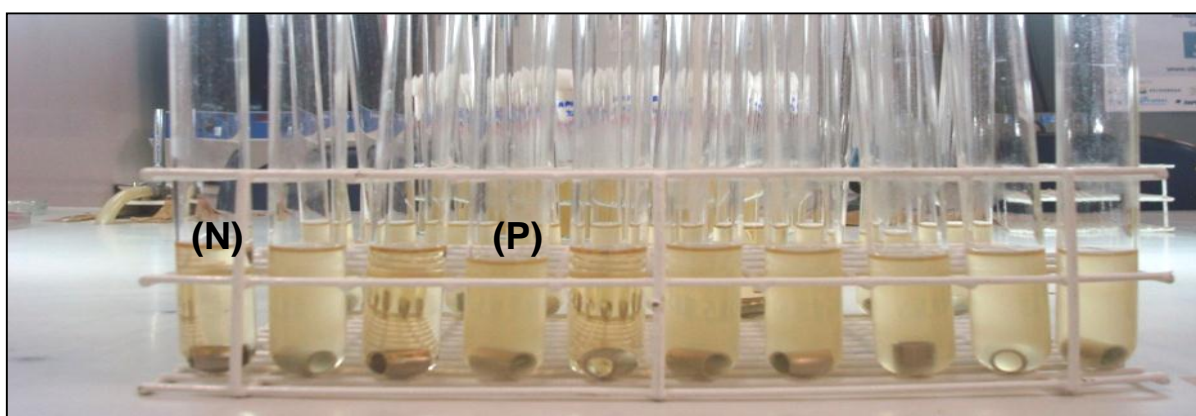
3.3.1.5 Procedimento da análise

A análise foi realizada segundo o INCQS/POP^o 65.3210.007 simplificado (BRASIL, 2009), usando-se 10 cilindros carreadores para cada bactéria padrão (ANDRADE;

CARELLI; MARTINS, 2008; TIMENETSKY, 1990; TIMENETSKY; YANAGUITA; SILVA, 1992).

Esse é um método qualitativo em que o resultado é observado pela presença ou ausência de crescimento bacteriano, através da turvação do meio de cultura como mostra a Figura 5. Neste trabalho foi assumido como prova negativa a ausência de turvação em 100% dos 30 tubos. Na Figura 6 está apresentado o esquema do procedimento para cada bactéria teste.

Figura 5 – Aspecto dos tubos de ensaio evidenciando presença (P) e ausência(N) de turvação no método da diluição de uso (INCQS/POP N° 65.3210.007).



A placa de Petri foi esterilizada com duas folhas de papel de filtro Whatman n° 2 para absorção do excesso da suspensão da bactéria teste para recebimento dos 12 cilindros de aço inoxidável (2 reservas) contaminados, dispostos em posição vertical, isolados, e secos posteriormente em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 40 minutos (Figura 7a). Os dez carreadores foram colocados individualmente em contato com a solução desinfetante a intervalos de 1 minuto, cronometradamente, por um tempo de contato de 10 minutos (Figura 7b).

Na Figura 8 está detalhado o esquema das transferências dos cilindros após o contato com o desinfetante para os tubos das duas séries de subcultura. O meio usado para inoculação dos carreadores foi o caldo nutriente (Difco) adicionado do neutralizante tiosulfato de sódio 0,6% para as soluções de hipoclorito de sódio. Para as soluções à base de quaternário de amônia o meio de subcultura foi preparado com caldo Letheen (Difco) que é um caldo nutriente contendo os neutralizantes lecitina e polissorbato 80 (tween 80).

Os tubos permaneceram 48h na estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A leitura dos resultados foi feita pela observação da presença (P) ou ausência (N) do crescimento bacteriano, através da turvação do meio de cultura.

Figura 6 – Fluxograma do procedimento do método da diluição de uso (INCQS/POP N° 65.3210.007).

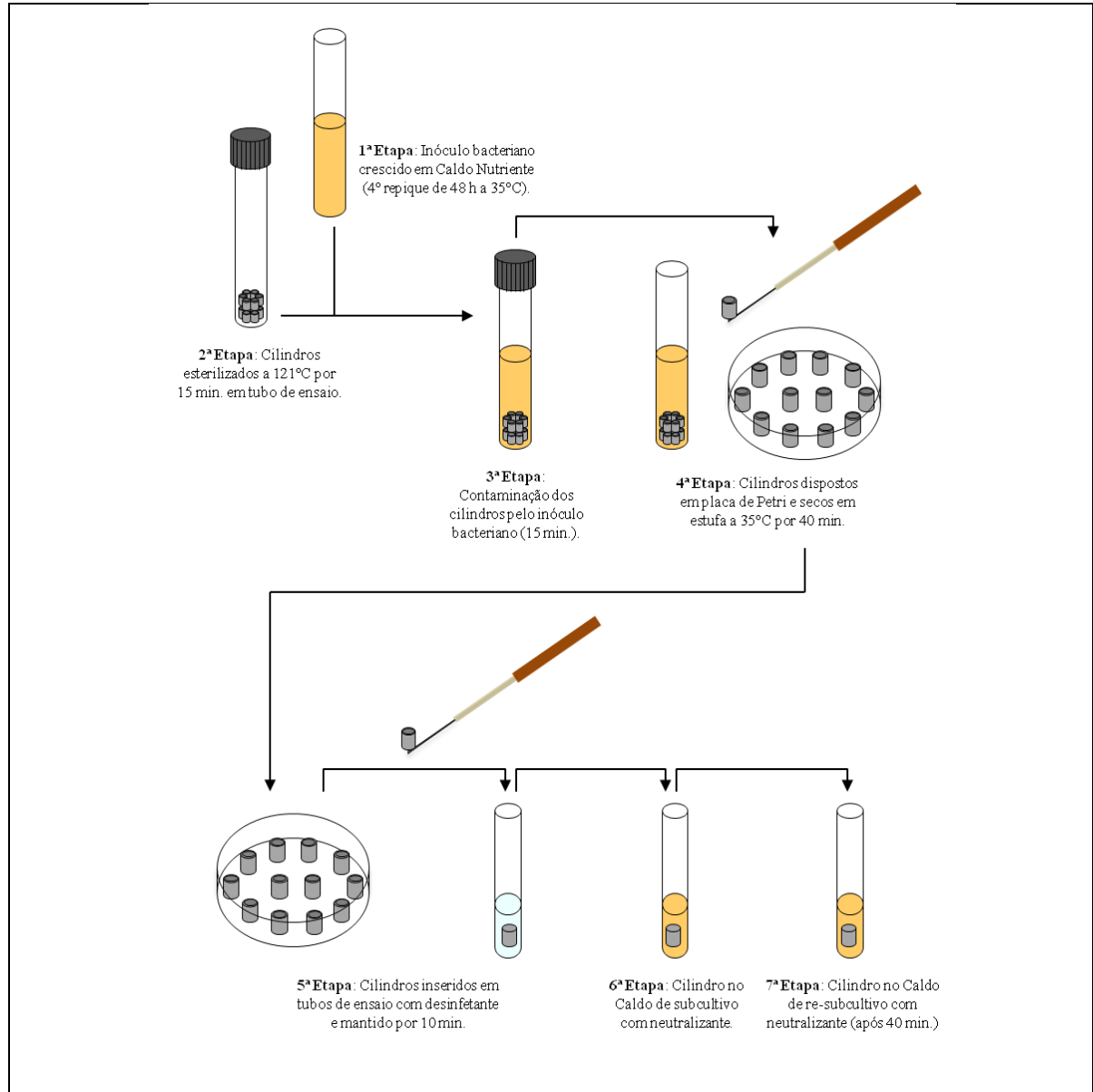


Figura 7 –Placa de Petri com cilindros de aço inoxidável contaminados e secos(a) e tubos de ensaio com cilindros em contato com solução desinfetante (b).

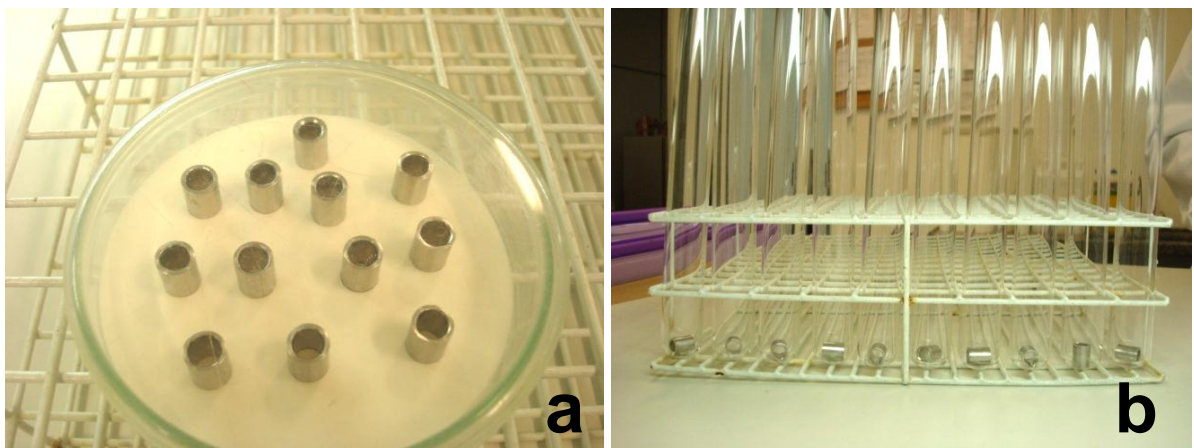
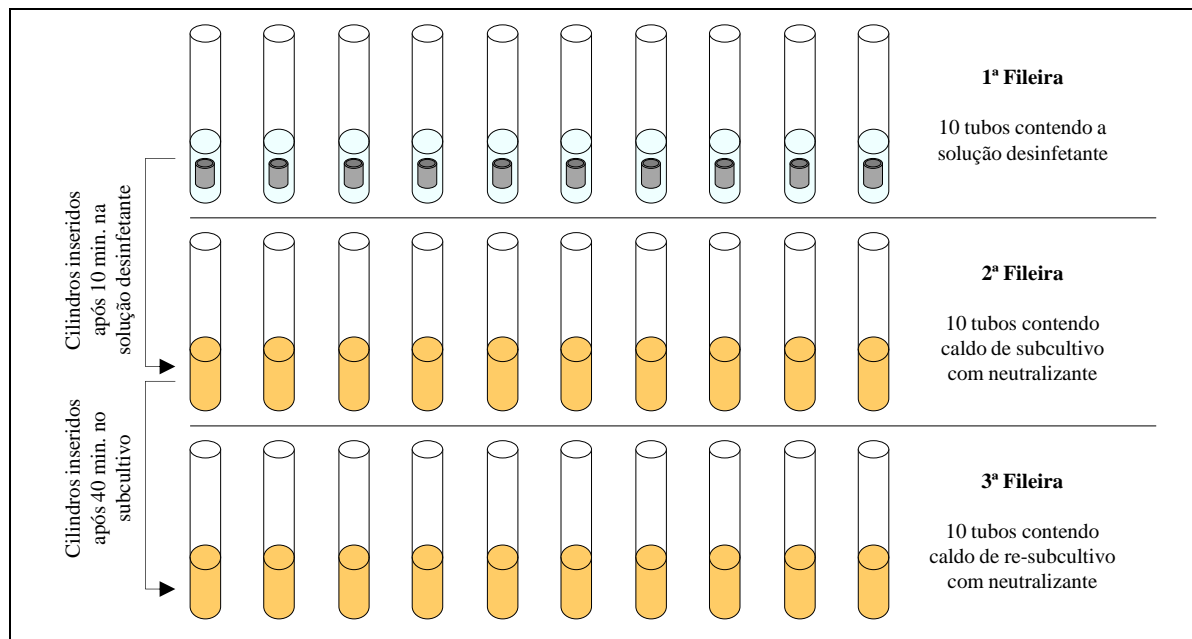


Figura 8 – Esquema das transferências dos cilindros (carreadores) da solução desinfetante para os tubos de subcultivos.



3.3.2 Método da suspensão (AOAC 960.09)

A eficiência antimicrobiana das soluções desinfetantes foi avaliada segundo o Método da AOAC 960.09 (*Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants*) (TOMASINO, 2007) e o Método AOAC 960.09 adaptado (OKAZAKI, 2003) para determinação da atividade antimicrobiana de desinfetantes à base de quaternário de amônia em concentrações acima de 200 mg/L.

3.3.2.1 Soluções desinfetantes

As soluções utilizadas foram preparadas com hipoclorito de sódio nas concentrações 5 mg/L, 100 mg/L e 200 mg/L e com quaternário de amônia (cloreto de benzalcônio) a 77mg/L e 10.000 mg/L.

3.3.2.2 Micro-organismos teste

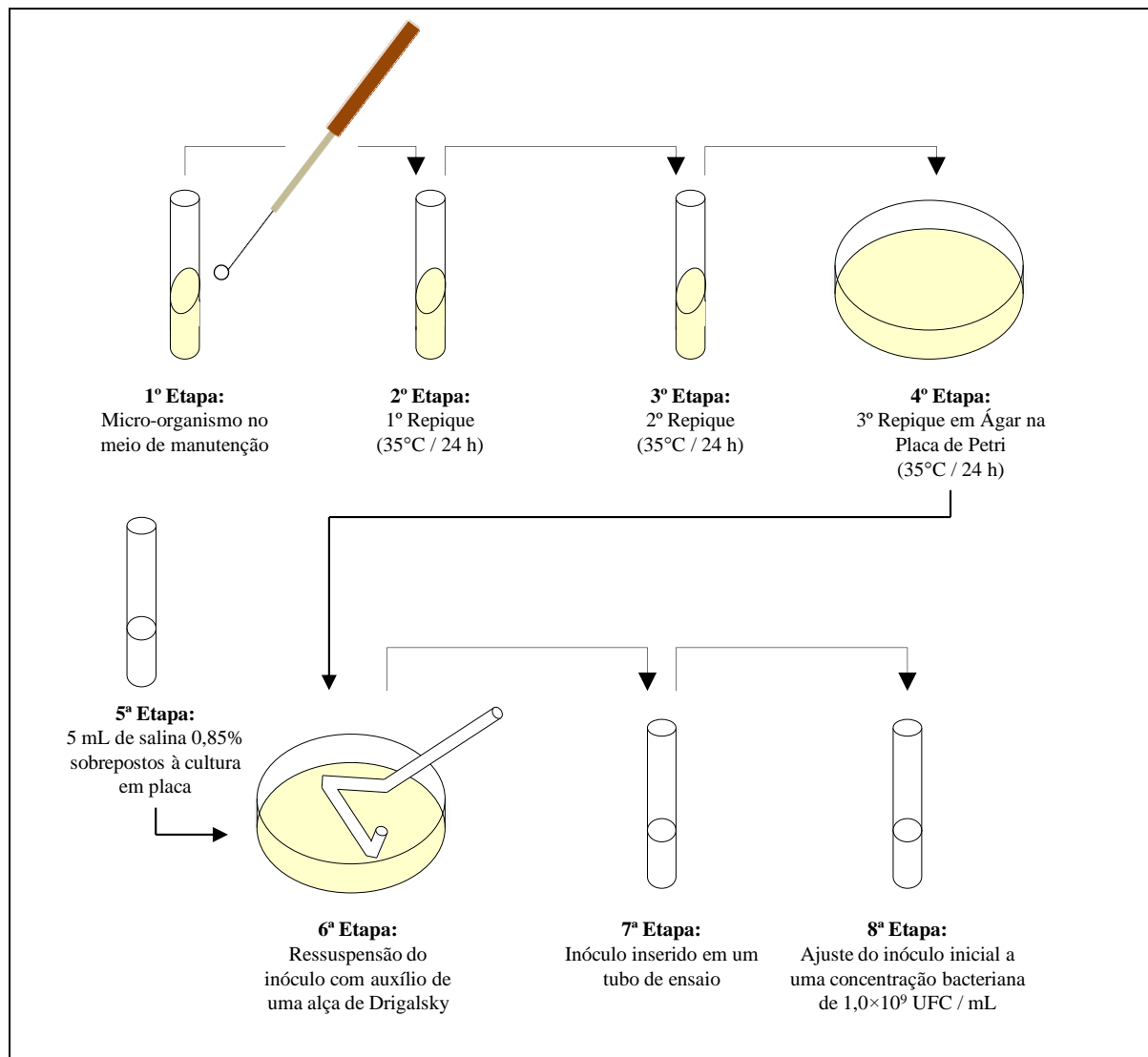
Foram usadas as duas culturas de bactérias padrão recomendadas na metodologia: *Staphylococcus aureus* INCQS N^o 00039 (ATCC 6538) e *Escherichia coli* INCQS

Nº00032(ATTCC 11229). As cepas foram provenientes do Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde (INCQS) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

3.3.2.3 Preparo da suspensão bacteriana

O preparo das suspensões bacterianas empregadas no ensaio está descrito no método AOAC 960.09 e esquematizado na Figura 9. Foram usadas placas de Petri 90 x 15 mm descartáveis, contendo ágar nutriente (Difco). Usou-se solução salina 0,85% para ressuspender as células na placa e fazer o ajuste da população bacteriana. Foram feitas diluições para alcançar uma população microbiana de aproximadamente 1×10^9 UFC/mL comparando-se a turbidez com o tubo 0,5 da escala de McFarland (HINDLER; JORGENSEN, 1995).

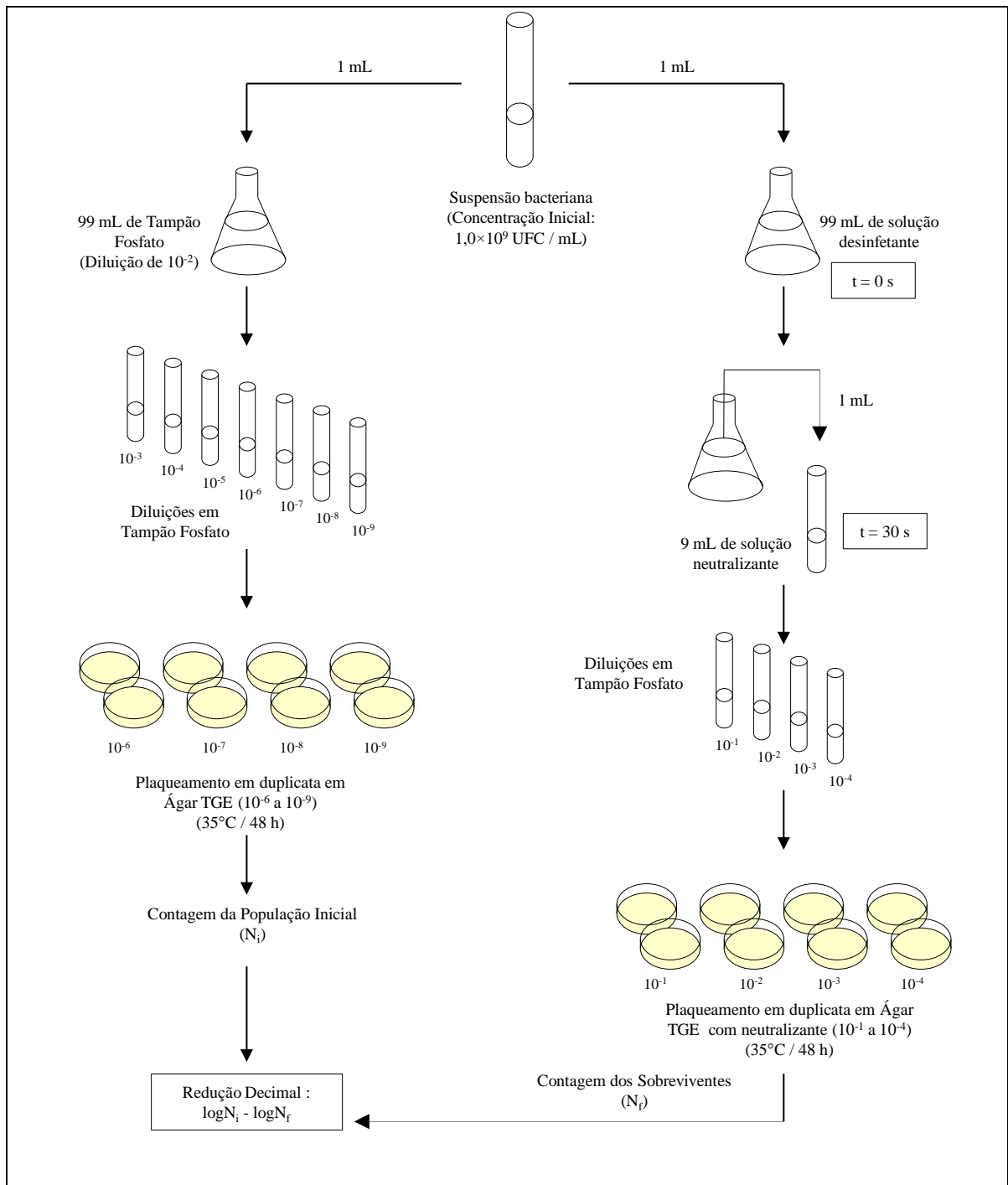
Figura 9 – Preparo do inóculo da cepa padrão para o uso no método da suspensão (AOAC 960.09).



3.3.2.4 Procedimento da análise

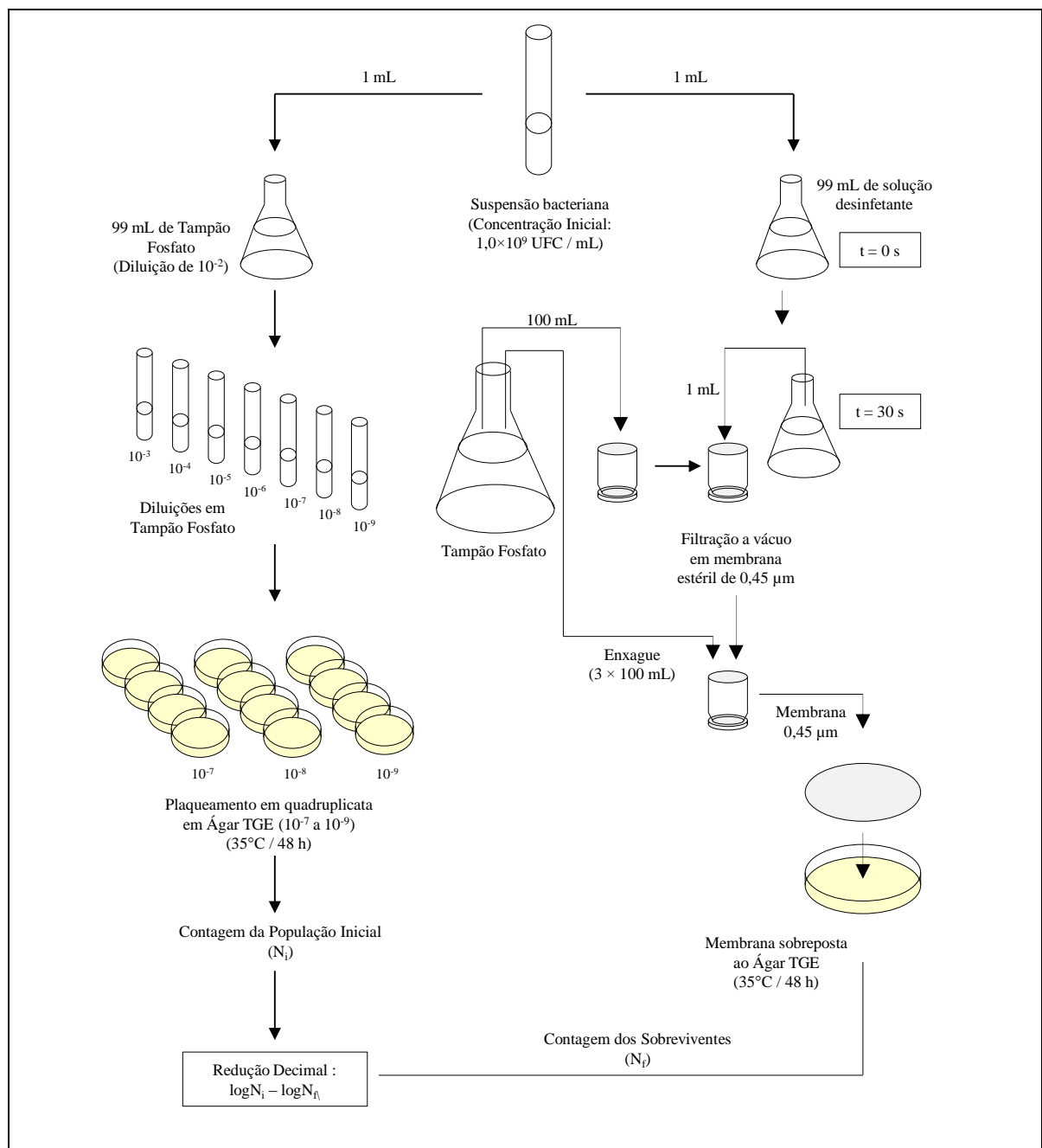
A Figura 10 mostra o procedimento do método da suspensão para as soluções de hipoclorito de sódio (5, 100 e 200 mg/L) e quaternário de amônia em concentrações < 200 mg/L.

Figura 10 – Procedimento do método da suspensão (AOAC 960.09) para os desinfetantes hipoclorito de sódio (5, 100 e 200 mg/L) e cloreto de benzalcônio (77 mg/L) contra as cepas padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 11.229.



Para a solução de cloreto de benzalcônio 10.000 mg/L utilizou-se o método da suspensão adaptado (OKAZAKI, 2003). Nessa técnica a neutralização do desinfetante foi substituída pelo processo de filtração com enxágue da membrana com tampão fosfato (Figura 11). Para os dois métodos da suspensão os resultados foram expressos em Reduções Decimais (RD) da população da bactéria teste, usando-se como parâmetro de aprovação para a eficiência antimicrobiana a RD maior ou igual a 5 ciclos logarítmicos.

Figura 11 – Procedimento do método da suspensão adaptado (OKAZAKI, 2003) para desinfetante à base de quaternário de amônio com concentração ≥ 200 mg/L.

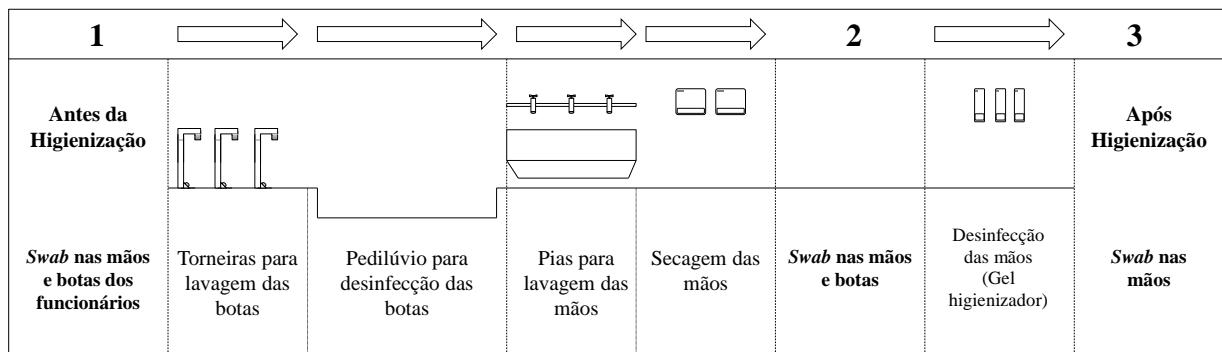


3.4 Métodos para verificação de bactérias heterotróficas cultiváveis nas mãos e nas botas dos manipuladores e nas caudas de lagosta

3.4.1 Pontos de coletas das amostras das mãos e das botas dos manipuladores

Em função da disposição dos equipamentos da sala de higienização do entreposto de pescado mostrados no fluxograma (Figura 12) a coleta das amostras foi feita em três pontos, em tempos distintos: mãos e botas antes da lavagem (1), mãos após a lavagem e secagem e botas após lavagem e desinfecção (2) e mão após desinfecção (3).

Figura 12 – Fluxograma do procedimento de higienização e pontos de coletas das amostras das mãos e das botas dos manipuladores em um Entreposto de Pescado em Fortaleza, Ceará.

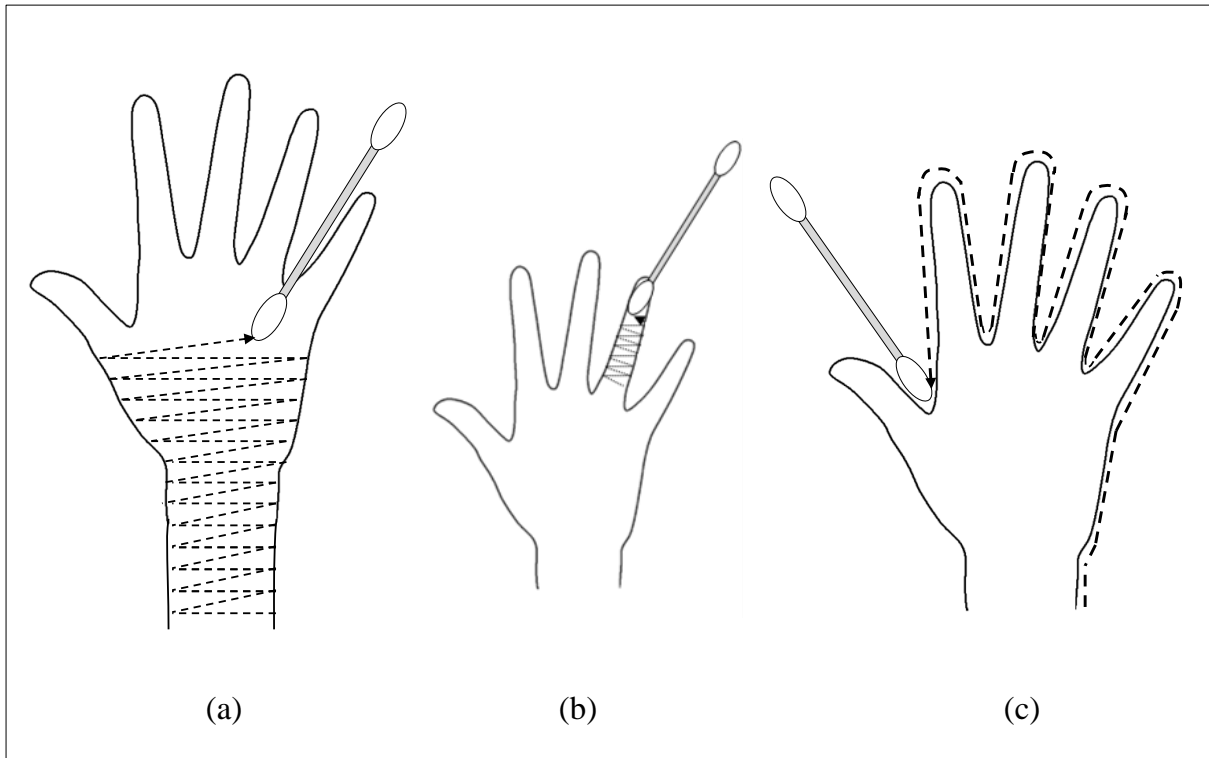


3.4.2 Análise microbiológica das mãos e das botas dos manipuladores

A amostragem foi feita mediante sorteio, de modo que o número de manipuladores correspondeu a 20% do número médio de operários envolvidos no trabalho diário de beneficiamento de pescado. Em cada coleta participaram três manipuladores, de maneira que, de cada um foram retiradas três amostras das mãos e duas das botas. Os funcionários foram previamente esclarecidos sobre o trabalho e deram seu consentimento.

As amostras das mãos dos manipuladores foram coletadas através da fricção de um *swab* em movimentos giratórios na palma de uma das mãos de cada manipulador iniciando o movimento descendente e ascendente desde o antebraço até a ponta dos dedos e em seguida na borda das mãos e entre os dedos, antes da lavagem (M₁), após a lavagem e secagem em papel toalha (M₂) e após desinfecção das mãos com gel higienizador (Ecolab Química Ltda.) (M₃). As regiões das coletas das mãos estão mostradas na Figura 13.

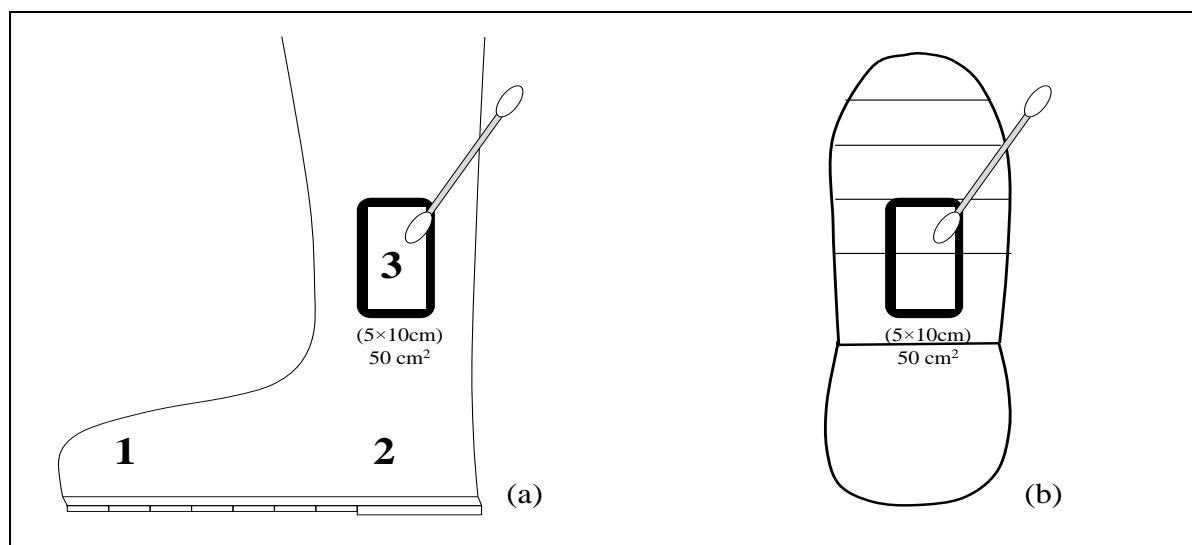
Figura 13 – Regiões de coleta por *swab* na mão: (a) *swab* do antebraço até a palma da mão, (b) *swab* no dedo e (c) *swab* no entorno da mão.



As amostras das botas de borracha foram coletadas passando um só *swab* em quatro regiões (laterais interna e externa, dorso e sola) de uma das botas do manipulador. Para cada região foi delimitada a área de 50 cm² (5 x10 cm²) totalizando 200 cm² por bota. As coletas foram feitas antes da lavagem (B₁) e após a lavagem e sanitização (B₂). O responsável pela coleta foi orientado para fazer a troca das luvas antes e após a higienização das botas para evitar contaminação cruzada. As regiões das coletas nas botas são mostradas na Figura 14. Após a coleta o *swab* foi colocado em tubos de ensaio contendo 9mL de solução salina 0,85% estéril e as amostras foram transportadas em caixas isotérmicas com gelo onde permaneceram refrigeradas até o momento da análise no LABOMAR/UFC.

As análises microbiológicas das mãos e das botas dos manipuladores foram feitas através do método de contagem padrão em placas (CPP) de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) (VIEIRA; TÔRRES, 2004) usando as diluições decimais de 10⁻¹ a 10⁻³ e 10⁻⁴ a 10⁻⁶ respectivamente.

Figura 14 – Regiões de coleta das botas por swab: (a) dorso (1) e laterais (2 e 3) e (b) sola.



Tanto para as amostras das mãos quanto das botas foram semeadas alíquotas de 1mL em placas de Petri descartáveis em duplicata utilizando a técnica *pour plate* em *Tryptone Glicose Extrato Ágar* (TGEA). As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas. Foram selecionadas aquelas que continham entre 25 e 250 colônias para a contagem, e determinada pela multiplicação do número médio de colônias das duas placas vezes o inverso da diluição inoculada. O resultado foi expresso em Unidade Formadora de Colônias (UFC/mão) das mãos e (UFC/cm²) das botas.

Os resultados das contagens de BHC para as mãos e botas foram distribuídos nas faixas estabelecidas como mostra o Quadro 5. Devido à falta de padrão nacional e/ou internacional para comparar os resultados obtidos foram seguidas as sugestões de Andrade, Brabes e Silva (2003), Poerner *et al.* (2009) para micro-organismos mesófilos aeróbios nas mãos dos manipuladores. Também não foi encontrada na literatura parâmetro que definisse o limite de aceitação de bactérias heterotróficas, aceitáveis para as botas higienizadas.

Quadro 5 – Faixas de contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis das mãos (UFC/mão) e das botas (UFC/cm²) dos manipuladores.

Amostra	Faixas de contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis				
	1	2	3	4	5
Mãos	$\leq 10^2$	$>10^2$ e $\leq 10^3$	$>10^3$ e $\leq 10^4$	$>10^4$ e $\leq 10^5$	$>10^5 \leq 10^6$
Botas	$\leq 10^1$	$>10^4$ e $\leq 10^5$	$>10^5$ e $\leq 10^6$	$>10^6$ e $\leq 10^7$	$>10^7 \leq 10^8$

3.4.3 Análise microbiológica das caudas de lagosta

As amostras das caudas de lagosta foram coletadas dentro das caixas isotérmicas com gelo na ocasião da chegada da matéria-prima (L_1) e depois da lavagem (L_2) realizada pelos manipuladores, simultaneamente com a seleção, no setor de recepção do Entrepasto.

Foi passado um *swab* na carapaça, no abdômen e na musculatura exposta da lagosta, próxima ao cefalotórax, em triplicata. Este procedimento foi realizado retirando nove caudas de três diferentes caixas isotérmicas, de modo a formar uma amostra composta por três *swabs*. O material foi imerso em tubo de ensaio contendo 9mL de solução salina 0,85% esterilizada. O mesmo procedimento de coleta foi feito após a lavagem das caudas de lagosta que ficavam distribuídas em monoblocos de polietileno de alta densidade prontas para entrarem no salão de beneficiamento. O processo foi repetido dez vezes, em dias diferentes de recebimento da matéria-prima.

Foram previamente definidas as diluições que seriam usadas na inoculação das placas para as amostras colhidas antes e depois do procedimento de lavagem na indústria, ficando assim definidas, respectivamente 10^{-2} a 10^{-4} e 10^{-1} a 10^{-3} .

Foi utilizado o método de contagem padrão em placas, pela técnica de *spread plate* usando-se alíquota de 0,1 mL das diluições sobre placas de Petri contendo *Tryptone Glicose Extrato Àgar* (TGEA). As placas foram incubadas a 35°C por 48 horas, e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC/cauda).

O cálculo das Unidades Formadoras de Colônias das caudas de lagosta foi feito multiplicando-se o número de colônias pelo inverso da diluição x 10. O resultado era dividido por 9.

Os resultados das CPP das amostras das mãos, das botas e das caudas de lagosta foram transformados em logaritmo decimal (\log_{10} UFC/mão; \log_{10} UFC/cm²; \log_{10} UFC/cauda), para o cálculo das reduções decimais (RD) das populações microbianas.

As RD para as mãos, as botas e as caudas foram determinadas pela diferença entre os logaritmos das contagens das populações iniciais e finais das superfícies analisadas em cada etapa dos procedimentos de higienização ($RD = \log N_i - \log N_f$).

3.5 Análise estatística

Os resultados das contagens das BHC foram submetidos à análise estatística utilizando o Programa Statsoft Statistica 7.0. As contagens das UFC das mãos dos manipuladores (M_1 , M_2 e M_3) foram submetidas à análise de variância (ANOVA), considerando-se $\alpha = 0,05$, complementada com o teste de Tukey, em caso de rejeição da hipótese de nulidade. Para as análises estatísticas das UFC das botas (B_1 e B_2) e das caudas de lagosta (L_1 e L_2) foi realizado o teste t de Student, considerando-se $\alpha = 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Eficiência antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio utilizando o método da diluição de uso (INCQS/POP Nº65.3210.007)

A Tabela 1 mostra os resultados dos testes do MDU para as soluções de hipoclorito de sódio (HClO) nas concentrações de 5mg/L pH 8,68; 100mg/L pH 10,09 e 200mg/L pH 10,38 evidenciando que não houve eficiência antimicrobiana na eliminação das três bactérias padrão testadas. Nos ensaios em concentrações de 5, 100 e 200 mg/L , 100% dos tubos apresentaram turbidez e somente em uma das repetições os 30 tubos apresentaram-se negativos. Supõe-se que essa discrepância esteja relacionada a um erro de operador, uma vez que, se em uma concentração maior ocorreu crescimento das cepas o lógico seria que em concentrações menores este fato também fosse observado.

O MDU é um método qualitativo e trabalhoso requerendo recursos humanos especializados para cumprir apenas essa metodologia (TIMENETSKY, 1990; TIMENETSKY, 2002). Segundo Omidbakhsh (2012), certos aspectos do método exige sensibilidade do operador. O autor exemplifica que, a colocação dos cilindros nos tubos de ensaio com caldo de crescimento requer muita habilidade e firmeza nas mãos.

Quando se aplicou o MDU utilizando-se água sanitária com teor de cloro ativo declarado, 2,0 a 2,5%, não houve crescimento das cepas testadas, confirmando sua eficiência na desinfecção de ralos e vasos sanitários conforme atesta o rótulo do produto. Timenestky *et al.*(1992) verificaram que a água sanitária (cloro ativo 2,8%) atingiu os padrões do teste da diluição de uso quando diluída a 1:200 (0,5% ou 5000 mg/L). Teixeira, Daher e Oliveira (2012) avaliaram a ação antimicrobiana de hipoclorito de sódio a 3%, contra cepas padrão de *S. aureus*, *S. Choleraesuis*, *P. aeruginosa*, pelo MDU utilizado em uma indústria químico-farmacêutica no Estado do Ceará e concluíram que o desinfetante mostrou eficiência antimicrobiana. É aceitável então que, as concentrações das soluções testadas no MDU, sendo muito inferiores a essas concentrações, poderiam apresentar resultados negativos, isto é, serem ineficazes no seu objetivo bactericida.

A eficiência bactericida do cloro é afetada pela concentração, pelo tempo de exposição sobre a superfície, pela concentração de micro-organismos e pelo pH da solução. No MDU concentração e tempo são padronizados e controlados no preparo das soluções por um tempo de contato pré-determinado de 10 minutos. No entanto, a população do inóculo em contato com o desinfetante não é ajustada como ocorre no teste quantitativo da suspensão

(AOAC 960.09). Além do que, não há uma padronização do número de bactérias aderidas à superfície dos cilindros após a contaminação e secagem em estufa. Alfano, Cole e Rutala (1988) mostraram que há diferenças nas retenções das bactérias teste aos cilindros, quando quantificaram *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella Choleraesuis* na aplicação do MDU.

Tabela 1 – Resultados dos tubos positivos para as bactérias padrão: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Choleraesuis* e *Escherichia coli*, utilizando-se soluções de hipoclorito de sódio (5, 100 e 200 mg/L) em 10 tubos por cepa no Método da Diluição de Uso (INCQS/POP N°65.3210.007).

Concentração das soluções (mg/L)	pH	Tubos positivos por cepa padrão			Resultado do teste	
		<i>S.aureus</i>	<i>S. Choleraesuis</i>	<i>E coli</i>		
5	8,68	1/10	0/10	3/10	4/30	(P)
		10/10	10/10	7/10	27/30	(P)
		0/10	10/10	0/10	10/30	(P)
		10/10	10/10	0/10	20/30	(P)
		10/10	10/10	0/10	20/30	(P)
100	10,09	1/10	0/10	3/10	4/30	(P)
		0/10	0/10	3/10	3/30	(P)
		0/10	0/10	0/10	0/30	(N)
		0/10	5/10	8/10	13/30	(P)
		2/10	4/10	0/10	6/30	(P)
200	10,38	1/10	0/10	0/10	1/30	(P)
		4/10	0/10	1/10	5/30	(P)
		1/10	1/10	1/10	3/30	(P)
		0/10	4/10	2/10	6/30	(P)
		1/10	0/10	7/10	8/30	(P)

(P) presença de crescimento bacteriano (reprovada); (N) ausência de crescimento bacteriano (aprovada).

Segundo Tomasino (2007), os MDU que avaliam a atividade antimicrobiana de desinfetantes usando cilindros têm sido criticados com relação a extrema variabilidade nos resultados. A falta de procedimento para enumeração da população microbiana aderida aos cilindros é uma das limitações dos métodos, incluindo os que avaliam atividade esporicida. Essa observação justificou a condução de vários estudos colaborativos para a padronização dos métodos, aumento da reprodutibilidade nos laboratórios e melhoria da qualidade dos dados (ARLEA *et al.*, 2008; OMIDBAKSH, 2012; TOMASINO; FIUMARA; COTTRILL, 2006; TOMASINO, HAMILTON, 2006; TOMASINO; PINES; HAMILTON, 2012; TOMASINO; SAMALOT-FREIRE, 2007).

Tomasino (2007) propôs que adensidade bacteriana máxima por carreador fosse 1×10^7 UFC como requisito de validade para os MDU da AOAC 955.15 (*S.aureus*) e AOAC 964.02

(*P. aeruginosa*). Alguns autores propuseram uma modificação do método para permitir a diluição das culturas de ensaio final, com contagens entre 10^6 e 10^7 UFC. O estabelecimento desse intervalo ajudaria a melhorar a confiabilidade do método e permitiria resultados mais consistentes entre e inter laboratórios (ARLEA *et al.*, 2008; TOMASINO; PINES; HAMILTON, 2012).

Timenetsky (2002) citou que cada cilindro, quando contaminado, apresentaria aproximadamente 10^6 UFC de bactérias, portanto em 60 cilindros haveria cerca de 6×10^7 UFC de bactérias. Se sobrevivesse uma única célula em um cilindro, o meio turvaria e poderia desqualificar o desinfetante. Por outro lado, se nenhum cilindro permitisse a recuperação de bactérias sobreviventes, segundo o autor, haveria a redução de pelo menos 7 ciclos logarítmicos (99,99999%) de uma população microbiana. Reduções menores não seriam possíveis ser detectadas pelo MDU.

Como se trata de um método qualitativo que avalia o resultado pela presença ou ausência de turvação, pelos resultados obtidos neste trabalho, a totalidade das amostras testadas com hipoclorito de sódio estariam desclassificadas. A baixa reprodutibilidade do MDU, explicitado por vários pesquisadores, não ocorreu com as soluções de hipoclorito testadas, talvez porque as concentrações usadas foram suficientemente baixas não sendo mesmo capazes de eliminar as cepas bacterianas testadas. Omidbakhsh (2012) cita que a natureza qualitativa do método requer a concentração do ingrediente ativo do desinfetante suficientemente elevada para assegurar que todos os carreadores, ou pelo menos um do total, deva estar livre de quaisquer organismos viáveis. Isso não está de acordo com as tendências atuais para a sustentabilidade, a segurança humana e a proteção ambiental.

O hipoclorito de sódio (NaClO) é o agente químico usado em maior quantidade e frequência dentro do entreposto de pescado. É utilizado em solução na desinfecção de equipamentos, superfícies inanimadas, que entram em contato com o pescado e na água de abastecimento interno da indústria.

As concentrações das soluções de NaClO, usadas sobre as diversas superfícies do entreposto determinam seu poder sanitizante e não esterilizante. O cloro confere toxicidade em concentrações elevadas além de ter cheiro forte, ser corrosivo e instável (ANDRADE; PINTO; ROSADO, 2008; LEITÃO, 2002).

Outro aspecto questionado é com relação ao pH da solução de NaClO, determinante para a eficiência da sanitização, comprovado por Bremer; Monk e Butler(2002) e Lund *et al.*

(2005). É uma verificação importante, pois, dependendo do seu valor o cloro dissolvido na água terá maior ou menor ação antimicrobiana.

Em pH mais ácido, haverá maior presença de ácido hipocloroso (HClO) podendo ser esperada, inclusive, a eficiência esporicida do cloro. Essa forma não dissociada é cerca de 80 vezes mais bactericida do que a forma do íon hipoclorito (OCl⁻). Para que ocorra a desinfecção é necessário que o pH esteja abaixo de 8,0 pois, nesse pH tem-se, aproximadamente, 35% de ácido hipocloroso disponível. Em pH 8,5, 9,0 e 9,5 tem-se aproximadamente 12%, 5% e 2% de HClO respectivamente, o que é insuficiente para o processo de desinfecção (AKUTSU, 2001; ANDRADE; CARELLI; MARTINS, 2008).

As soluções analisadas de hipoclorito de sódio preparadas com água destilada estéril apresentaram valores médios de pH 8,68 para a solução de 5 mg/L; de 10,09 para a de 100mg/L, e, de 10,38 para a de 200mg/L. O MDU não prevê o ajuste do pH das soluções, portanto, os valores de pH podem ter influenciado a presença de células microbianas nos tubos, desclassificando as soluções. Os resultados encontrados por Akutsu (2001) sugerem que o uso de hipoclorito de sódio corrigido para pH 8,0 ou 7,0 pode ser escolhido sem prejuízo da eficiência do processo de higienização.

4.2 Eficiência antimicrobiana das soluções de quaternário de amônia (cloreto de benzalcônio) usando método da diluição de uso (INCQS/POP Nº65.3210.007)

Os resultados dos testes da diluição de uso para as soluções do desinfetante à base de amônia quaternária mostraram variações (Tabela 2). Houve efetividade na eliminação do crescimento bacteriano nos tubos, em duas repetições, das duas concentrações testadas. Dessa forma, somente as amostras 2 e 5 seriam aprovadas pelo MDU nas condições avaliadas.

Apesar de o teste desqualificar o desinfetante pela presença de turvação pelo menos em um dos trinta tubos, como assumido neste trabalho, observa-se nos resultados da presente pesquisa que as amostras das soluções com a maior concentração (10.000 mg/L) mostraram menor número de tubos positivos.

Okasaki (2003) analisou soluções de cloreto de benzalcônio de vários desinfetantes comerciais com concentrações variando de 50 mg/L a 10.000 mg/L frente as cepas padrão *S. aureus*, *S. Choleraesuis* e *E. coli*. pelo MDU da AOAC Para a maior concentração seus resultados aprovaram uma marca, para as bactérias *S. Choleraesuis* e *S. aureus*. Para as concentrações de 50 mg/L e 100 mg/L quando foram testadas quatro marcas, sanitizante.

Tabela 2 – Resultado dos tubos positivos para as bactérias padrão: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Choleraesuis* e *Escherichia coli*, utilizando-se soluções de cloreto de benzalcônio (77 e 10.000 mg/L) em 10 tubos por cepa no Método da Diluição de Uso (INCQS/POP N°65.3210.007).

Concentração dasoluções (mg/L)	Tubos positivos por cepa padrão			Resultado do teste	
	<i>S. aureus</i>	<i>S. Choleraesuis</i>	<i>E.coli</i>		
77	9/10	8/10	0/10	17/30	(P)
	0/10	0/10	0/10	0/30	(N)
	7/10	10/10	9/10	26/30	(P)
	7/10	9/10	10/10	26/30	(P)
	0/10	0/10	0/10	0/30	(N)
10.000	1/10	2/10	0/10	3/30	(P)
	0/10	0/10	0/10	0/30	(N)
	4/10	4/10	4/10	12/30	(P)
	1/10	1/10	0/10	2/30	(P)
	0/10	0/10	0/10	0/30	(N)

(P) presença de crescimento bacteriano (reprovada); (N) ausência de crescimento bacteriano (aprovada)

Andrade, Carelli e Martins (2008) apresentaram uma síntese de várias pesquisas nas quais foi estudada a resistência de *Enterococcus faecium* a vários agentes sanitizantes, dentre eles quaternário de amônia alcalino (1% pH 10,0) através do MDU da AOAC. O resultado mostrou aprovação para o sanitizante, com 100% dos tubos negativos. O quaternário de amônia tem boa eficiência contra bactérias Gram positivas, porém no presente estudo essa propriedade não foi realizada para *Staphylococcus aureus*.

Teixeira; Daher e Oliveira analisaram, pelo MDU, desinfetante a base de quaternário de amônia a 1% (10.000 mg/L) utilizado em uma indústria químico-farmacêutica, contra as cepas padrão *S. aureus*, *S. Choleraesuis* e *P. aeruginosa*, e concluíram que o desinfetante não teve eficiência antimicrobiana na concentração testada. Esse resultado assemelha-se ao encontrado nesse trabalho quanto a ineficiência e a turvação dos tubos com a bactéria Gram positiva *S. aureus*.

4.3. Eficiência antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio utilizando o método da suspensão (AOAC 960.09)

Os resultados obtidos com relação às reduções decimais da população bacteriana apresentadas nos testes com soluções de hipoclorito de sódio encontram-se na Tabela 3. Houve variação dos resultados nas repetições das três concentrações das soluções analisadas contra as cepas testadas. No entanto, a solução na concentração de 200 mg/L apresentou o maior número de amostras aprovadas (60%), se for considerada a RD de 5 ciclos logarítmicos, como preconiza

o método. Silva *et al.* (2003) avaliaram a resistência ao hipoclorito de sódio pelo método da Suspensão AOAC 960.09 e observaram que os tratamentos com 100 e 200 mg/L do sanitizante mostraram-se eficazes contra a cepa padrão de *E. coli* ATCC 11229, promovendo mais de 5 reduções decimais na população alvo. Se fosse considerada apenas essa cepa, os resultados deste estudo teriam apresentado eficácia em 80% das repetições para a solução na concentração de 200 mg/L.

Mesmo não atingindo o critério de aprovação de 5 ciclos logarítmicos, a maioria das soluções nas concentrações de 5mg/L, 100mg/L e 200 mg/L atingiram RD entre 4 e 5. São valores que não merecem ser desprezados, se for considerado esses resultados na aplicação prática do processo de sanitização, pois significam uma redução decimal da população microbiana entre 99,99% e 99,999%.

Tabela 3 – Reduções Decimais (ciclos logarítmicos) da população bacteriana quando testadas soluções de hipoclorito de sódio em concentrações 5, 100 e 200 mg/L contra cepas padrão *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, utilizando-se o Método da Suspensão (AOAC 960.09).

Concentração das soluções (mg/L)	Reduções Decimais		Resultado
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	
5	6,49	6,81	(A)
	4,90	5,17	(R)
	5,00	5,60	(A)
	4,03	5,37	(R)
	5,40	3,45	(R)
100	6,30	7,66	(A)
	7,04	4,57	(R)
	5,00	4,55	(R)
	4,77	5,80	(R)
	2,46	1,45	(R)
200	6,59	7,19	(A)
	5,25	5,18	(A)
	5,00	5,96	(A)
	4,35	5,30	(R)
	6,40	2,15	(R)

(A) Aprovada; (B) Reprovada

4.4 Eficiência antimicrobiana das soluções de quaternário de amônia (cloreto de benzalcônio) utilizando o método da suspensão (AOAC 960.09)

Os resultados das RD na população bacteriana, obtidos quando se usa soluções de quaternário de amônia encontram-se na Tabela 4. Os resultados entre as repetições foram praticamente semelhantes quanto à aprovação ou reprovação nas duas concentrações testadas.

Somente uma repetição das soluções de quaternário de amônia 77mg/L foi aprovada. Deve-se considerar que mesmo as que não foram aprovadas, seus valores apresentaram-se muito próximos de 5 ciclos logarítmicos. Quando a concentração foi 10.000 mg/L, quatro repetições das amostras foram aprovadas, conforme o método preconiza para as reduções decimais (acima de 5 ciclos logarítmicos) em um tempo de 30s. Essa é a concentração recomendada pelo fabricante do cloreto de benzalcônio para uso em pedilúvio.

Tabela 4 – Reduções Decimais (ciclos logarítmicos) da população bacteriana quando testadas soluções de quaternário de amônia (cloreto de benzalcônio) em concentrações 77 e 10.000 mg/L contra cepas padrão *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, utilizando-se o Método da Suspensão (AOAC 960.09).

Concentração das soluções (mg/L)	Reduções Decimais		Resultado
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	
77	6,90	6,44	(A)
	6,00	0,97	(R)
	4,80	4,10	(R)
	4,66	6,91	(R)
	4,36	5,33	(R)
10.000	6,72	7,32	(A)
	7,04	3,74	(R)
	7,46	8,92	(A)
	7,44	6,91	(A)
	7,36	6,33	(A)

(A): Aprovado; (B): Reprovado.

4.5 Repetibilidade dos Métodos: Diluição de uso e Suspensão

Nas Tabelas 5 e 6 são comparados os resultados obtidos através do MDU (INCQS/POP Nº 65.3210.007) e do Método da Suspensão (AOAC, 960.09) com relação à porcentagem de concordância na aprovação ou reprovação das amostras quando utilizado hipoclorito de sódio e quaternário de amônia (cloreto de benzalcônio).

Tabela 5 – Comparação dos resultados obtidos através do Método da Diluição de Uso (INCQS/POP Nº 65.3210.007) e o Método da Suspensão (AOAC, 960.09) com relação à porcentagem de concordância na

aprovação ou reprovação das amostras quando utilizadas as concentrações de hipoclorito de sódio (5, 100 e 200 mg/L).

Concentração da solução (mg/L)	Teste diluição de uso	Teste da suspensão (RD)	Concordância (%)
5	(P)	≥ 5	60
	(P)	< 5	
	(P)	≥ 5	
	(P)	< 5	
	(P)	< 5	
100	(P)	≥ 5	60
	(P)	< 5	
	(N)	< 5	
	(P)	< 5	
	(P)	< 5	
200	(P)	≥ 5	40
	(P)	≥ 5	
	(P)	≥ 5	
	(P)	< 5	
	(P)	< 5	

Critérios de aprovação: MDU: (N) ausência de crescimento bacteriano (aprovada). Método Suspensão: RD ≥ 5 ciclos logarítmicos

Tabela 6 – Comparação dos resultados obtidos através do Método da Diluição de Uso (INCQS/POP Nº 65.3210.007) e o Método da Suspensão (AOAC, 960.09) com relação à porcentagem de concordância na aprovação ou reprovação das amostras quando utilizadas as concentrações de quaternário de amônia (cloreto de benzalcônio) (77 e 10.000 mg/L).

Concentração das soluções(mg/L)	Método da diluição de uso	Método da suspensão (RD)	Concordância (%)
77	(P)	≥ 5	40
	(N)	< 5	
	(P)	< 5	
	(P)	< 5	
	(N)	< 5	
10.000	(P)	≥ 5	20
	(N)	< 5	
	(P)	≥ 5	
	(P)	≥ 5	
	(N)	≥ 5	

Critérios de aprovação: MDU: (N) ausência de crescimento bacteriano (aprovada). Método Suspensão: RD ≥ 5 ciclos logarítmicos.

As tabelas 5 e 6 mostram que quando foi comparado os resultados dos dois métodos para as soluções de hipoclorito de sódio para as concentrações 5 e 100 mg/L o grau de concordância (60%), pela não aprovação, foi maior do que a comparação feita para as soluções de quaternário de amônia 77 e 10.000 mg/L. Observa-se que a não uniformidade dos resultados obtidos das repetições empregando-se MDU em relação a maior repetibilidade do método da

suspensão contribuiu para um grau de concordância mais baixo. Segundo Tomasino (2007), a falta de procedimento para enumeração da população microbiana aderida aos cilindros é uma das limitações dos MDU da AOAC.

Okazaki (2003) fez uma avaliação comparativa entre o método de suspensão modificado (AOAC 960.09 para concentração de quaternário de amônia ≥ 200 mg/L) e o método de diluição de uso da AOAC para duas marcas de desinfetantes a base de quaternário de amônia em concentração 10.000 mg/L e mostrou concordância de 100 % para as bactérias *S. aureus* e *E.coli* respectivamente para cada uma das marcas. O resultado (20%) desse trabalho para as soluções de 10.000 mg/L considera as duas bactérias teste do método da suspensão.

4.6. Contagem Padrão em Placas (CPP) das bactérias heterotróficas cultiváveis nas mãos e nas botas dos manipuladores e nas caudas das lagostas

4.6.1 Contagem Padrão em Placas (CPP) das mãos e das botas dos manipuladores

As Tabelas 7 e 8 mostram os resultados das contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis nas mãos dos manipuladores antes (M_1) e após a lavagem (M_2) e após a sanitização (M_3) e as porcentagens de acordo com as faixas em que foram distribuídas.

Não há padrões ou especificações para contagens microbianas nas mãos de manipuladores de alimentos (ANDRADE; BRABES; SILVA, 2003; ANDRADE *et al.*, 2008; POERNER *et al.*, 2009) e nem para as botas. Andrade *et al.* (2008) sugerem que a indústria de alimentos proponha limites de segurança para garantir que o procedimento de higienização seja efetivo e o que for estabelecido seja alcançado. Os autores propõem que a contagem de mesófilos aeróbios nas mãos de manipuladores seja inferior a 10^4 UFC/mão e este foi o padrão comparativo usado nesta pesquisa, para se afirmar se houve eficiência no processo de higienização das mãos dos manipuladores no Entrepasto de Pescado, analisado em Fortaleza-CE.

As contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis após a lavagem (M_2) atingiram até 10^5 UFC/mão. Oitenta e sete por cento (87%) das mãos dos manipuladores apresentaram contagens iguais ou inferiores a 10^4 UFC/mão após a lavagem e cem por cento (100%) após a sanitização. Considerando como referência o valor preconizado pelos autores citados anteriormente, os resultados nas contagens bacterianas das mãos dos manipuladores, obtidos neste trabalho após a higienização completa (lavagem e sanitização) foram considerados satisfatórios.

Tabela 7 – Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (UFC/mão) das mãos dos manipuladores, antes (M₁) e após (M₂) a lavagem e após a sanitização (M₃) no Entrepasto de Pescado, Fortaleza-CE.

Manipulador	Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis(UFC/mão)		
	Antes da lavagem (M ₁)	Após a lavagem (M ₂)	Após a sanitização (M ₃)
1	1,36 x 10 ³	5,7 x 10 ²	2,75 x 10 ³
2	8,0 x 10 ¹	5,0 x 10 ¹	1,0 x 10 ¹
3	1,35 x 10 ²	8,1 x 10 ²	7,0 x 10 ¹
4	4,35 x 10 ²	7,9 x 10 ³	3,9 x 10 ²
5	2,0 x 10 ¹	1,0 x 10 ¹	8,0 x 10 ¹
6	3,6 x 10 ²	7,25 x 10 ²	1,55 x 10 ²
7	3,2 x 10 ⁴	9,0 x 10 ¹	4,5 x 10 ²
8	1,35 x 10 ³	4,5 x 10 ²	3,05 x 10 ²
9	1,1 x 10 ⁴	1,5 x 10 ³	8,8 x 10 ³
10	2,85 x 10 ²	2,85 x 10 ²	1,0 x 10 ¹
11	3,25 x 10 ²	1,16 x 10 ⁵	1,04 x 10 ³
12	1,42 x 10 ⁴	1,31 x 10 ⁴	1,75 x 10 ³
13	4,55 x 10 ⁴	6,6 x 10 ³	2,1 x 10 ²
14	6,05 x 10 ²	5,3 x 10 ²	2,95 x 10 ²
15	3,45 x 10 ²	6,05 x 10 ²	1,0 x 10 ¹

Tabela 8 – Valores percentuais das faixas de contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis(UFC/mão) após os procedimentos de lavagem(M₂) e de sanitização (M₃) das mãos dos manipuladores, no Entrepasto de Pescado, Fortaleza-CE.

Procedimentos	Faixas de contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis				
	≤10 ²	>10 ² e ≤10 ³	>10 ³ e ≤10 ⁴	>10 ⁴ e ≤10 ⁵	>10 ⁵ e ≤10 ⁶
Lavagem	20,0	47,0	20,0	6,6	6,6
Sanitização	33,3	40,0	26,6	-	-

Esses valores foram superiores aos encontrados por Andrade, Brabes e Silva (2003) ao avaliarem as condições higiênicas em 12 restaurantes industriais e encontrarem contagens de até 10⁴ UFC/mão, para mesófilos aeróbios, em 67,56% de amostras colhidas de mãos consideradas higienizadas pelos manipuladores. Maiores ainda foram os valores encontrados por Almeida *et al.*(1995) em mãos de manipuladores no setor de cocção de carnes de uma cozinha universitária, em níveis de até 10⁷UFC/mão.

As contagens elevadas das pesquisas referidas podem ser justificadas em parte pela não implantação obrigatória dos Procedimentos Padrões de Higiene Operacional (PPHO), como ocorre nos Entrepastos de pescado. No entanto, a não aplicação correta dos PPHO nesses estabelecimentos pode resultar em contagens altas de mesófilos aeróbios como constataram Sousa *et al.* (2011) ao avaliarem a qualidade microbiológica de superfícies, equipamentos e

luvas em uma indústria de processamento de pescado e verificarem que as luvas não descartáveis apresentavam contagens variando de 3,3 a 6,8 \log_{10} UFC/luva.

Após a lavagem 66,7% das mãos dos manipuladores tiveram uma RD média da carga bacteriana de 0,62 ciclo logarítmico. Após a sanitização, os resultados aumentaram para 80% e 0,73 ciclo logarítmico, respectivamente (Tabela 9). Os valores observados após a higienização completa revelaram RD baixas. Esses resultados mostraram na sua grande maioria, valores abaixo de 1 ciclo logarítmico (0,62 e 0,73), com somente dois manipuladores apresentando valores de RD (1,85 e 2,34), bem superior à média.

Almeida *et al.* (1995) também encontraram variações nas RD quando analisaram as mãos de manipuladores de uma cozinha universitária em Campinas-SP, antes e após a aplicação de medidas corretivas para lavagem. O tempo de cada etapa foi controlado e os elementos de limpeza foram água, sabonete líquido neutro e solução iodóforo. Encontraram RD variáveis de 0,3 a 2,6 entre os manipuladores, tendo a maioria apresentado valores acima de 1 log UFC/mão.

A prática de lavagem das mãos reduz as sujidades e a microbiota transitória da pele quando o procedimento é executado corretamente pelos manipuladores, e a indústria fornece os saneantes ideais nas quantidades necessárias. As mãos são partes sensíveis do corpo e essa condição aumenta a necessidade de limpeza, porém é um trabalho individual e se não ocorre um monitoramento visual do processo, o bom resultado fica a mercê da vontade de cada manipulador cumprir as orientações do treinamento recebido. O uso de sabão antisséptico, cujo princípio ativo é triclosan (0,5%), e a desinfecção posterior com, álcool gel, na higienização das mãos dos manipuladores do entreposto, mostraram leve efetividade, observada através das RD da carga bacteriana.

Paulson *et al.* (1999) avaliaram a eficácia de quatro programas de lavagem de mão de manipuladores na redução de micro-organismos transitórios da pele e concluíram que a maior eficácia no controle antimicrobiano, no setor alimentício, foi a lavagem das mãos com sabão antisséptico, seguida da aplicação de álcool gel. Eficácia semelhante desse processo de higienização foi relatada pelos autores Penna, Mazzola e Martins (2001).

Da mesma maneira que a higienização das mãos faz parte do processo de PPHO na indústria, também participam desse item, a lavagem e desinfecção das botas de borracha usadas pelos manipuladores. As tabelas 11 e 12 mostram que 93,2% das botas avaliadas apresentaram contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis entre 10^4 e 10^8 UFC/cm² após a sanitização, que 66,7% das botas não apresentaram RD e que tiveram RD média 0,559.

Tabela 9 – Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (logUFC/mão) das mãos dos manipuladores no Entrepasto de Pescado, Fortaleza-CE, antes (M_1) e após (M_2) a lavagem e após a sanitização (M_3) e Reduções Decimais (RD) das contagens bacterianas após a lavagem e a sanitização.

Manipulador	Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (logUFC/mão)			RD	
	Antes da lavagem (M_1)	Após a lavagem (M_2)	Após a sanitização (M_3)	Após a lavagem [$M_1 - M_2$]	Após a sanitização [$M_1 - M_3$]
1	3,133	2,756	3,439	0,377	NRD
2	1,903	1,699	1,000	0,204	0,903
3	2,130	2,908	1,845	NRD	0,285
4	2,638	3,897	2,591	NRD	0,047
5	1,301	1,000	1,903	0,301	NRD
6	2,556	2,866	2,190	NRD	0,366
7	4,505	1,954	2,653	2,551	1,852
8	3,130	2,653	2,484	0,477	0,643
9	4,041	3,176	3,944	0,865	0,097
10	2,455	2,190	1,000	0,265	0,455
11	2,512	5,066	3,017	NRD	NRD
12	4,152	4,117	3,243	0,035	0,909
13	4,658	3,819	2,322	0,839	2,336
14	2,782	2,724	2,470	0,244	0,312
15	2,538	2,782	1,000	NRD	0,538
			RD		
			Mínima	0,035	0,047
			Máxima	2,551	2,336
			Média ± Desvio padrão	0,616 ± 0,73	0,726 ± 0,70

NRD – não houve redução logarítmica

Os altos valores das CPP de bactérias heterotróficas cultiváveis do percentual das botas que não tiveram suas contagens reduzidas, ou apresentaram baixas RD, sugerem que o procedimento de higienização não foi eficiente.

A lavagem das botas no entreposto é realizada manualmente através do esfregão com uma escova de cabo longo, usando detergente e água, acionada com o contato do pé. A higienização é complementada quando o manipulador o imerge as botas na solução de quaternário de amônia ao passar pelo pedilúvio,

Algumas hipóteses poderiam explicar os altos valores da contagem de microorganismos aeróbios nas botas: em algumas coletas observou-se pouco ou nenhum detergente disponível, fato que limita a retirada dos resíduos; lavagem negligente dos manipuladores; lavagem manual das botas somente no dorso e laterais. Esse último fato, possivelmente influenciou nos resultados uma vez que, a coleta com *swab* abrangia também o solado do calçado.

Tabela 10 – Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (UFC/cm²) das botas dos manipuladores no Entrepasto de Pescado, Fortaleza-CE, antes da lavagem (B₁) e após a sanitização (B₂), e valores percentuais das faixas de contagens bacterianas após a sanitização.

Manipulador	Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis(UFC/cm ²)				
	Antes da lavagem (B ₁)		Após a sanitização (B ₂)		
1	2,65 x 10 ⁵		1,00 x 10 ⁴		
2	4,25 x 10 ⁵		1,03 x 10 ⁶		
3	4,25 x 10 ⁵		1,80 x 10 ⁵		
4	4,20 x 10 ⁵		9,40 x 10 ⁵		
5	7,75 x 10 ⁶		1,18 x 10 ⁷		
6	1,00 x 10 ¹		1,00 x 10 ¹		
7	4,25 x 10 ⁷		5,15 x 10 ⁷		
8	1,35 x 10 ⁵		7,10 x 10 ⁵		
9	1,00 x 10 ¹		1,25 x 10 ⁵		
10	3,00 x 10 ⁴		3,50 x 10 ⁴		
11	1,10 x 10 ⁵		2,15 x 10 ⁶		
12	5,00 x 10 ⁴		1,50 x 10 ⁴		
13	2,00 x 10 ⁵		1,00 x 10 ⁵		
14	1,00 x 10 ⁵		1,20 x 10 ⁵		
15	1,50 x 10 ⁴		1,00 x 10 ⁴		
Faixas de contagens bacterianas	≤10 ¹	>10 ⁴ ≤ 10 ⁵	>10 ⁵ ≤10 ⁶	>10 ⁶ ≤10 ⁷	>10 ⁷ <10 ⁸
(%) após a sanitização	6,8	26,6	40,0	13,3	13,3

Empresas fabricantes de equipamentos para indústria de pescado disponibilizam lavadores de botas mecanizados dotados de escovas rotativas cilíndricas que permitem lavar as botas completamente, sola, superfície do pé e cano. A evolução no desenvolvimento dessas máquinas reflete a preocupação de uma higienização industrial mais completa do calçado usado pelos manipuladores, com a finalidade de reduzir a carga microbiana na sola das botas transportadas para a área de processamento.

A solução sanitizante de cloreto de benzalcônio disposta no pedilúvio é usada com a finalidade de desinfecção das botas, para redução da carga microbiana remanescente após a lavagem. Alguns fatores podem ter influenciado na baixa ação do sanitizante como: limpeza deficiente praticada no processo de lavagem das botas, seja pelos resíduos orgânicos deixados, por exemplo: proteínas ou substâncias tensoativas aniônicas presentes nos detergentes, ambas incompatíveis com compostos de amônia quaternária (ANDRADE, PINTO ROSADO, 2008); concentração da solução usada no pedilúvio e o período de exposição ao sanitizante que segundo a recomendação do fabricante (Diversey Johnson) é de no mínimo 1%, por 10 minutos. O tempo de contato das botas com a solução é muito curto, alguns segundos, tempo suficiente para o manipulador atravessar o pedilúvio de 1,35m de comprimento. A recomendação do fabricante é de 10 minutos, porém reconhece-se que esse tempo causaria grande transtorno no

gabinete de higienização pelo acúmulo de operários e em consequência atraso no turno de trabalho.

Tabela 11 –Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (logUFC/cm²) das botas dos manipuladores antes da lavagem (B₁) e após a sanitização (B₂) e Reduções Decimais (RD) após a sanitização no Entreposto de pescado, Fortaleza-CE.

Manipulador	Bactérias heterotróficas cultiváveis(logUFC/cm ²)		RD após a sanitização [B ₁ – B ₂]
	Antes da lavagem (B ₁)	Após a sanitização (B ₂)	
1	5,423	4,000	1,423
2	5,628	6,015	NRD
3	5,628	5,255	0,373
4	5,623	5,973	NRD
5	6,889	7,072	NRD
6	1,000	1,000	NRD
7	7,628	7,712	NRD
8	5,130	5,851	NRD
9	4,000	5,097	NRD
10	4,477	4,544	NRD
11	5,041	6,332	NRD
12	4,699	4,176	0,523
13	5,301	5,000	0,301
14	5,000	5,079	NRD
15	4,176	4,000	0,176
		RD	
		Mínima	0,176
		Máxima	1,423
		Média ± Desvio padrão	0,559 ± 0,489

NRD – não houve redução logarítmica decimal

As soluções de cloreto de benzalcônio avaliadas no teste de suspensão para a concentração usada no pedilúvio (77 mg/L) mesmo as que não obtiveram aprovação de eficiência antimicrobiana mostraram RD próximas de 5 ciclos logarítmicos, valores bem acima dos encontrados para as botas dos manipuladores, após a desinfecção. Então se supõe que todos os fatores acima comentados podem interferir numa situação prática de sanitização de uma planta industrial de pescado diferentemente do que ocorre quando se executa protocolos dos testes em laboratório. Os testes *in vitro* conferem apenas a atividade antimicrobiana de um produto desinfetante, mas não a real capacidade de desinfecção de uma superfície, que por sua vez pode ter diversos fatores interferentes, prejudicando a atividade de um composto ativo (TIMENETSKY; ALTERTHUM, 1989). Tanto para os tratamentos das mãos (M₁, M₂ e M₃) quanto para os das botas (B₁ e B₂) não houve diferença significativa entre as contagens bacterianas ($p > 0,05$).

4.6.2 Contagem Padrão em Placas (CPP) das caudas das lagostas

As caudas de lagosta avaliadas apresentaram contagens de bactérias mesófilas antes da lavagem entre $1,55 \times 10^3$ e $4,55 \times 10^4$ UFC/cauda e $1,37 \times 10^3$ e $1,0 \times 10^4$ UFC/cauda após a lavagem (Tabela 12). Estas contagens são consideradas baixas levando-se em consideração que se trata da carga bacteriana presente na matéria-prima crua que carrega a microbiota do habitat e a adquirida no manuseio, destacando-se a retirada do cefalotórax, e no transporte.

A lagosta é um crustáceo que, imediatamente após a captura, é imerso em solução com água gelada contendo metabissulfito de sódio, com o objetivo de evitar o escurecimento enzimático e oxidativo (melanose). Esse aditivo é relatado como inibidor de crescimento bacteriano. Góes *et al.* (2006) ao avaliarem a ação antimicrobiana do metabissulfito de sódio na pós-colheita do camarão *Litopenaeus vannamei* concluíram que decresceu o número de unidades formadoras de colônias nas sete espécies de vibrio isoladas, em função do uso de metabissulfito, ficando demonstrada a sua ação inibitória sobre as bactérias mesófilas aeróbias devido à sua ação antioxidante.

A quantificação de micro-organismos viáveis, aeróbios e mesófilos de um alimento (CPP) é um dos indicadores mais utilizados para se investigar se a limpeza, a desinfecção e o controle da temperatura foram adequadamente cumpridos durante o processamento industrial, aliados ao transporte e ao armazenamento do produto. Além disso, pode-se inferir sobre alterações incipientes, a provável vida útil daquele produto, e a falta de controle no descongelamento ou desvios na temperatura pré-estabelecida de refrigeração (ICMSF, 1984).

Quando o alimento está em decomposição e pode ser detectado por odor, gosto, ou aparência a maioria dos alimentos apresenta mais do que 10^6 UFC/g. Alguns alimentos podem tornar-se inaceitáveis com 10^7 UFC/g, enquanto outros podem ser consumidos até com 10^8 (ICMSF, 1978).

A legislação da ANVISA (BRASIL, 2001) para pescado não limita micro-organismos viáveis aeróbios mesófilos para pescado uma vez que é sabido que quem tem influência na decomposição do pescado são os psicrófilos (SIMMONDS; LAMPRECHT, 1980). Este fato foi confirmado por Vieira (1986) quando correlacionaram caracteres sensoriais e qualidade microbiológica de caudas de lagosta (*Panulirus argus* e *P. laevicauda*) estocadas em gelo em laboratório e concluíram que o número de bactérias obtido a 35° C não apresentava correlação linear com a Soma dos Caracteres Sensoriais (SCS) apresentando-se irregular ao longo dos dias de estocagem.

Tabela 12–Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis (UFC/cauda e logUFC/cauda) das caudas das lagostas comercializadas no Entrepósito de Pescado, Fortaleza-CE, antes (L₁) e após (L₂) a lavagem e Reduções Decimais (RD) após a lavagem.

Amostras	Contagens de bactérias heterotróficas cultiváveis				RD após a lavagem [logL ₁ –log L ₂]
	Antes da lavagem (L ₁)		Após a lavagem (L ₂)		
	UFC/cauda	LogUFC/cauda	UFC/cauda	LogUFC/cauda	
1	4,55x 10 ⁴	4,659	1,00 x 10 ⁴	4,000	0,659
2	7,89 x 10 ³	3,897	1,70 x 10 ³	3,230	0,667
3	1,49 x 10 ⁴	4,173	5,00 x 10 ³	3,699	0,474
4	1,67 x 10 ³	3,222	9,28 x 10 ³	3,967	NRD
5	1,33 x 10 ⁴	4,125	8,17 x 10 ³	3,912	0,213
6	6,72 x 10 ³	3,828	1,37 x 10 ³	3,136	0,692
7	9,00 x 10 ³	3,954	2,39 x 10 ³	3,378	0,576
8	1,55 x 10 ³	3,192	6,78 x 10 ³	3,831	NRD
9	1,12 x 10 ⁴	4,050	2,50 x 10 ³	3,398	0,652
10	3,61 x 10 ³	3,558	1,94 x 10 ³	3,289	0,269
RD					
Mínima					0,213
Máxima					0,692
Média ± Desvio padrão					0,525 ± 0,189

NRD – não houve redução decimal

Jay (2005) compilou dados de alguns autores que estudaram a qualidade microbiológica de vários frutos do mar e mostraram que em um estudo de 1.315 caudas de lagosta congelada crua, 74% das amostras foram satisfatórias quando apresentaram contagens de aeróbios em placas $\leq 10^6$ UFC/g. Em pesquisa microbiológica semelhante para camarão sem casca, cru, 94% das 1.468 amostras foram satisfatórias quando apresentaram $\leq 10^7$ UFC/g.

O procedimento de higienização da matéria-prima tem características diferentes daquelas adotadas para as mãos e botas dos manipuladores. O processo utilizado no setor de recebimento inclui somente a lavagem com água hiperclorada 5 mg/L, que cai através de chuveiros, sem usar fricção.

As soluções com essa concentração de cloro quando foram testadas a eficiência antibacteriana pelo método da suspensão mostraram valores de RD superiores ou muito próximos de 5 ciclos logarítmicos. No entanto, as baixas RD obtidas ($< 0,6 \log_{10}$ UFC/cauda) das amostras de cauda de lagosta, colhidas numa situação prática durante o processo de beneficiamento, mostraram que houve leve diminuição das bactérias heterotróficas depois da lavagem.

Os teores de CRL analisados nas amostras de hipoclorito de sódio colhidas no entreposto de pescado e apresentados na Tabela 13 se mostraram inferiores daqueles declarados pelo fornecedor. Considerando que esses são os valores que servem de base para a indústria proceder a cloração da água de abastecimento supõem-se que a concentração da água manteve-se, durante o período de coletas das caudas de lagosta, sempre inferior a 5 mg/L, diferente das soluções preparadas em laboratório com a real concentração de CRL. Arlea *et al.* (2008), Reybrouck (1992) e Timenetsky *et al.* (1992) citam que protocolos laboratoriais não correspondem às reais condições nas quais os produtos são usados, refletindo extrema variabilidade nos resultados da ação antimicrobiana dos desinfetantes.

Tabela 13 – Concentrações de cloro residual livre (CRL) das amostras de hipoclorito de sódio declaradas pelo fornecedor e analisadas e pH analisados nas amostras.

Coleta	Hipoclorito de sódio Concentração de CRL		pH analisado
	Valor declarado (variação) (%)	Valor analisado (%)	
1 ^a	N F*	5,50	13,07
2 ^a	10,65 (9 - 11)	5,60	12,59
3 ^a	10,44 (9 - 11)	8,13	13,07
4 ^a	10,33 (9 - 11)	9,44	13,15
5 ^a	10,95 (9 - 12)	8,19	12,86

* NF: Não fornecido à indústria.

O curto tempo de contato (alguns segundos) da matéria-prima com a água no processo de lavagem pode ter contribuído para a baixa RD da população bacteriana das caudas de lagosta. Outra possibilidade é que a matéria orgânica associada com esses crustáceos pode neutralizar o cloro antes que a letalidade possa ser manifestada. Uma das desvantagens do uso do cloro é a inativação pela matéria orgânica como afirmam Andrade, Pinto e Rosado (2008).

É largamente reconhecido que a lavagem é usada principalmente como um processo higiênico, muito mais do que como um tratamento de descontaminação, não tendo efetividade sobre a morte de bactérias patogênicas da superfície do pescado. Quando camarões e lagostas são mergulhados ou lavados em água clorada os números de bactérias são, normalmente, reduzidos. Contudo, a lavagem, mesmo somente, com água potável pode reduzir a carga microbiana em torno de 90%. Quando a água clorada é usada não está claro se a redução da carga microbiana é devido ao efeito físico da lavagem ou ao efeito desinfetante do cloro (FAO/OMS, 2000).

O efeito benéfico resultantes do uso de água clorada para reduzir a carga microbiana de alimentos aumentando a vida útil é bastante citado na literatura.

O efeito de gelo clorado (5mg/L de cloro ativo) foi avaliado sobre os parâmetros químicos e microbiológicos de carpa capim (*Ctenopharyn godonidella*) demonstrando que sua vida-de-prateleira pode ser aumentada em, aproximadamente, três dias se for utilizado cloro no gelo de armazenagem (SCHERER *et al.*, 2004). O tempo de contato do gelo clorado com o peixe é superior ao contato da água clorada no processo de lavagem, proporcionando, portanto um maior efeito do cloro.

Outros setores da indústria de processamento de alimentos principalmente com relação à sanitização de vegetais usam concentrações mais altas de cloro quando comparadas com a água de lavagem da matéria-prima do setor de pescado. Lund *et al.* (2005) usaram hipoclorito de sódio nas concentrações de 100 e 200mg/L por 15 minutos na redução da carga microbiana de mandioca minimamente processada. Srebernich (2007) utilizou solução de hipoclorito de sódio a 120 mg/L por 15 minutos no controle da microbiota acompanhante do cheiro-verde minimamente processado. Berbari, Paschoalino e Silveira (2001) observaram o efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada usando as concentrações de 70, 100 e 130mg/L de cloro.

Os resultados desses trabalhos mostraram efetividade do cloro usado para sanitização, mostrando que a concentração influencia no efeito bactericida.

5 CONCLUSÕES

1. Não houve eficiência antimicrobiana das soluções de hipoclorito de sódio (5, 100 e 200 mg/L) quando analisadas pelo Método da Diluição de Uso (ICNQS/POPNº65321.007) contra as cepas testadas *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Choleraesuis* e *Escherichia coli*, mas houve aprovação em pelo menos uma repetição pelo Método da Suspensão (AOAC 960.09) para *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.
2. Foi comprovada eficiência antimicrobiana das soluções de quaternário de amônia (77 e 10.000 mg/L) pelos dois métodos testados em pelo menos uma repetição.
3. O grau de concordância de eficiência antimicrobiana das soluções dos sanitizantes testadas foi variável entre os Métodos da Diluição de Uso (ICNQS/POP Nº65321.007) e de Suspensão (AOAC 960.09) tendo esse último método mostrado maior número de aprovações.
4. Em função dos baixos valores das Reduções Decimais (RD) das bactérias heterotróficas cultiváveis das superfícies analisadas, a carga bacteriana inicial diferenciou a boa eficiência no processo de higienização das mãos e a ineficiência das botas dos manipuladores
5. O processo de higienização (lavagem) das caudas de lagosta foi eficiente mesmo considerando as baixas RD em razão da menor população inicial das bactérias heterotróficas cultiváveis
6. As Reduções Decimais encontradas para as cepas padrão (*Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*), analisadas pelo Método da Suspensão (AOAC 960.09), testando hipoclorito de sódio e quaternário de amônia, foram discrepantes das RD encontradas para as bactérias heterotróficas cultiváveis após o processo de higienização das mãos, botas e caudas de lagosta no Entreposto de Pescado estudado.

6 RECOMENDAÇÕES

Considerando que os desinfetantes químicos usados nos Entrepostos de Pescado são aprovados por testes oficiais de eficiência antimicrobiana realizados em laboratórios credenciados, as soluções de uso preparadas com esses desinfetantes são de inteira responsabilidade da indústria, podendo sofrer desvios intencional ou acidental da recomendação do fabricante. Portanto, recomenda-se que o entreposto de pescado proponha limites de segurança no ajuste das soluções desinfetantes utilizadas, no sentido de garantir sucesso nos procedimentos de higienização dos manipuladores e para que os objetivos planejados no Controle de qualidade do produto sejam alcançados.

REFERÊNCIAS

- ABNT-11833:1991 Associação Brasileira de Normas Técnicas , Comitê ABNT/CB 10 Química. Hipoclorito de sódio – especificações. Fixa as condições exigíveis para o fornecimento de hipoclorito de sódio como agente desinfetante. 3p. publicada 30/08/1991. Brasília.
- AKUTSU, C. K. **Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado**. 2001. 82 f.. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Viçosa , Viçosa, 2001.
- ALFANO, E.M.; COLE, E.C.; RUTALA, W.A. Quantitative evaluation of bacteria washed from stainless steel penicylinders during AOAC use-dilution method. **Journal Association of Official Analytical Chemists**, v.71, n.5, p.868 – 871, 1988.
- ALMEIDA, R. C. C.; KUAYE, A. Y.; SERRANO, A. M.; ALMEIDA, P. F. Avaliação e controle da qualidade microbiológica de mãos de manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 290-294. Aug. 1995.
- AMARAL, F. D.; PASCHOAL, C.; ROSSITTO, S. Escolha de desinfetantes é determinada por estudo e análise de pontos críticos. **Controle de Contaminação**, edição n. 110, NTE editorial, Jun. 2008.
- ANDRADE, N. J.; SILVA, R.M.M.; BRABES, K, C. S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Ciência agrotécnica**, Lavras, v.27, n.3, p.590-596. May-June, 2003.
- ANDRADE, N. J.; CARELLI, R. T.; MARTINS, A. D. O. Avaliação laboratorial de sanitizantes químicos. *In*: ANDRADE, N. J. **Higiene na indústria de alimentos**, São Paulo: Varela, p. 390-412, 2008.
- ANDRADE, N. J.; PINTO, C. L. O.; ROSADO, M. S. Controle da Higienização na Indústria de Alimentos. *In*: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela, p. 182-183, 2008.
- ANDRADE, N. J.; SALUSTIANO, V.C.; CARELLI, R.T ; BRABES, K,C.S ;PINTO, C. L. O. Metodologias convencionais para análises microbiológicas e equipamentos, utensílios e manipuladores na indústria de alimentos. *In*: ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos**. São Paulo: Varela, p. 334 - 358, 2008.
- ARLEA, C.; KING, S.; BENNIE, B.; KEMP, K.; MERTZ, E.; STAUB, R. Modifications to the AOAC use-dilution test for quaternary ammonium compound-based disinfectants that significantly improve method reliability. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 91, n. 1, p. 152-158, Jan./Feb. 2008.
- BERBARI, S. A. G.; PASCHOALINO, J. E. S.; SILVEIRA, N. F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 21, n. 2. p. 197-201, Mai/Ago. 2001.

BRASIL 2001, ANVISA/MS, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 12, de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimento**, 2001, DOU de 10 de janeiro de 2001.

BRASIL, ANVISA/MS. Portaria nº 15, de 23 de agosto de 1988. **Normas para registro de produtos saneantes domissanitários com finalidade antimicrobiana**. DOU de 05 de setembro de 1988.

BRASIL, ANVISA/MS, Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. **Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do MERCOSUL através da Resolução GMC nº 50/06**, DOU de 05 de março de 2007, Seção 1, p.50, 2007a.

BRASIL, DCI/DIPOA/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Circular Nº 245/96 de 25 de novembro de 1996. **Regulamenta a implantação do Programa de Procedimentos Padrão de Higiene Operacional (PPHO)**, 1996.

BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, Portaria Nº 46, de 10 de fevereiro de 1998. **Institui o Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle - APPCC a ser implantado, gradativamente, nas indústrias de produtos de origem animal sob o regime do Serviço de Inspeção Federal – SIF**, DOU de 16 de março de 1998, Seção 1, p.24, 1998.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), **Manual de procedimentos para implantação de estabelecimentos industrial do pescado: produtos frescos e congelados**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca, Brasília, MAPA, SEAP/PR, 116 p., 2007b.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Ofício circular GAB/DIPOA Nº 25/09, Brasília, 13 de novembro de 2009. **Estabelece os Procedimentos de Verificação dos Programas de Autocontrole em Estabelecimentos de Pescado e Derivados**, 2009b.

BRASIL, ANVISA/Ministério da Saúde. Resolução nº 211 de 18 de junho de 1999. **Atualização das Normas e Procedimentos referentes à Registro de Produtos Saneantes Domissanitários**. D.O.U de 21 de junho de 1999.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), RIISPOA – cap.II, art. 17, §2º – **Classificação dos Estabelecimentos de pescado e derivados** – Minuta da proposta de Revisão do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, Brasília, 2010a.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), RIISPOA – cap. I, Seção III, Subseção V, art. 202, §1º e 2º- **Define pescado**, Minuta da proposta de Revisão do Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal, Brasília, 2010b.

BRASIL, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comercio Exterior - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO), **Metodologia para Determinação do Peso Líquido de Pescado, Moluscos e Crustáceos Glaciados pré-medidos**, Portaria nº 38/INMETRO de 11 de fevereiro de 2010, DOU de 17 de fevereiro de 2010, Seção 1, p.73, 2010c.

BRASIL, MS/FIOCRUZ/Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde (INCQS), **Procedimento Operacional Padronizado (POP) nº 65.3210.007**, revisão 10, 2009a.

BREMER, P.J.; MONK, I.; BUTLER, R. Inactivation of *Listeria monocytogenes* / *Flavobacterium* spp. biofilms using chlorine: impact of substrate, pH, time and concentration. **Applied Microbiology**, Amsterdam, v.35, n.4, p. 321 -325, Oct. 2002.

BRUM, J. V. F. **Análise de perigos e pontos críticos de controle em indústria de laticínios de Curitiba-PR**. 129 f. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

CARELLI, R.T.; DIAS, A.S.; ANDRADE, N.J.; ANTUNES, M.A. Qualidade de água e condições higiênicas de manipuladores, equipamentos e utensílios em micro-indústrias de laticínios. **Revista Instituto Cândido Tostes**, Viçosa, v.58, n.33, p.85-88. 2003.

CHIU, CHENG-HSUN, SU, LIN-HUI; CHU, C. *Salmonella* entérica Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical, Disease, and Treatment: **Clin. Microbiol. Rev.**, v.17, n.2, p. 311- 322, Apr. 2004.

COLE, E. C., RUTALA, W. A., SAMSA, G. P. Disinfectant testing using a modified use-dilution method: collaborative study. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v. 71, n. 6, p. 1187-1194, Nov./Dec. 1988.

COLE, E. C.; RUTALA, W. A.; CARSON, J. L. Evaluation of penicylinders used in disinfectant testing: bacterial attachment and surface texture. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Gaithersburg, v. 70, n. 5, p. 903-906, Sept./Oct. 1987.

COTTRILL, M.P.; FIUMARA, R.M.; TOMASINO, S.F. Enumeration procedure for monitoring test microbe populations on inoculated carriers in AOAC use-dilution methods. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v.89, n.6, Nov./Dec. , p.169, 2006.

CUNHA-NETO, A.; SILVA, C. G. M.; STAMFORD, T. L. M. *Staphylococcus* enterotoxigênicos em alimentos *in natura* e processados no Estado de Pernambuco, Brasil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 263-271, set./dez. 2002.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S. *Staphylococcus aureus*. In: VIEIRA, R. H. S. F. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática**. São Paulo: Varela, p. 95-103, 2004.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S.; VIEIRA, R. H. S. F. Investigação sobre possíveis portadores de *Staphylococcus aureus* em duas indústrias de pesca. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 104-105, p. 49-57, jan./fev. 2003.

- FAO/WHO. **Codex Alimentarius**. Committee on fish and fishery products. Discussion paper on the use of chlorinated water. Twenty-fourth Session, Alesund. Norway, 5 – 9 June, 2000.
- FIGUEIREDO R. M. Programa de Redução de Patógenos (palestra). In: Fórum “Alimentação no 3º milênio”. São Paulo, realizado Nutrinems & Abia Food Service, 2000.
- GÓES, L.M. N.B.; MENDES, P. P.; MENDES, E.S.; RIBEIRO. C.M.F.; SILVA, R.P.P. Uso do metabissulfito de sódio no controle de micro-organismos em camarões marinhos *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931), **Acta Scientiarum Biological Science**. Maringá, v. 28, n. 2, p. 153-157, April/June, 2006
- HINDLER, J.A.; JORGENSEN, J.H. Procedures in antimicrobial susceptibility testing, chapter 3.B In: MAHON C.R.; MANUSELIS, G.J. **Diagnostic Microbiology**, p.58 – 89, 1995.
- HISLOP, N.; SHAW, K. Food safety knowledge retention study. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 2, p. 431-435, Feb. 2009.
- HUSS, H. H. **Assurance of seafood quality**. In: FAO Fisheries Technical Paper 334, Rome, p.46-66, 1994.
- ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Micro-organisms in foods 1 – Their significance and methods of enumeration**, 2th ed. 1978.
- ICMSF International Commission on Microbiological Specifications for Foods. **Micro-organisms in foods: técnicas de análise microbiológica**. Zaragoza: Acribia, 1984. 431p.
- JAY, J. M. Frutos do mar. In: JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. cap. 5. p. 119-130.
- LATIMER, G. W. The Official Methods of Analysis of AOAC. 19 th Edition: The Scientific Association Dedicated to Analytical Excellence. v. 1. 2012.
- LEITÃO, M. F. **Limpeza e sanificação na indústria de alimentos** In: Manual de Apoio (Curso de Aprimoramento). Série Qualidade e Segurança Alimentar, Projeto APPCC, CNI/SENAI/SEBRAE, Fortaleza-CE, 2001.
- LUCET, J.C.; RIGAUD, M.P. MENTRE, F.; KASSIS, N.; DEBLANGY, C.; ANDREMONT, A.; BOUVET, E. Hand contamination before and after different hand hygiene techniques: a randomized clinical trial. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, p.276-28, Mar. 2002.
- LUND, D. G.; PETRINI, L. A.; ALEIXO, J. A. G.; ROMBALDI, C. V. Uso de sanitizantes na redução da carga microbiana de mandioca minimamente processada. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.6, p.1431-1435. Nov-Dez. 2005.
- MACEDO, J. A. B. O processo de desinfecção pelo uso de derivados clorados em função do pH e Portaria 518/2004 do Ministério da Saúde. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 44., 2004, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Associação Brasileira de Química e sua Regional do Ceará, 2004. p. 20-24.

MARRIOTT, N.G; GRAVANI, R.B. Sanitation and the food industry. In: **Principles of food sanitation**, 5th edition, cap.1, p.1 -15, New York: Springer. 413p., 2006.

MINER, N.; ARMSTRONG, M.; CARR, C.D.; MAIDA, B.; SCHLOTFELD, L. Modified quantitative Association of Analytical Chemists Sporicidal Test for liquid chemical germicides. **Applied and Environmental Microbiology**, Fort worth, v.63, n.8, p. 3304 – 3307, Aug. 1997.

MOTA, T. M. B.; ALBUQUERQUE, A. J. D. Avaliação sumária da atividade de desinfetantes. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Santa Maria, v. 5, n. 4, p. 323–326, 1975.

MUTH, M. K.; FAHIMI, M.; KARNS, S. A. Analysis of *Salmonella* control performance in US young chicken slaughter and pork slaughter establishments. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 1, p. 6-13, Jan. 2009.

NOLL R.; OLIVEIRA, I.L; PESCADOR, J. XI-019 - Avaliação de dois métodos concorrentes usado na determinação do cloro em água tratada. In: XXVII CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL , ABES - Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, Porto Alegre, 3 -8 dezembro de 2000.

OKAZAKI, M. M. **Adaptação do método de suspensão para determinação da atividade bactericida de desinfetantes a base de cloreto de benzalcônio em concentrações acima de 200 mg/L**. 2003. 85p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA D. F.; MENDONÇA, A. T.; PICCOLI, R. H. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 6, p. 1893-1898, nov./dez. 2008.

OMIDBAKSH, N. Should the AOAC Use-Dilution Method be continued for regulatory purposes? **Journal of AAOA International**, Gaithersburg, v.95, n.2, p.406- 410, Jan. 2012.

ORTS, M. R.; MARTÍNEZ, J. L. S.; NAVARRETE, N. N.; SÁCHEZ, J. M. S. Mycotic pseudoaneurism produced by *Salmonella* Enteritidis in patient with fever of unknown origin. **Medicina Intensiva**, Barcelona, v. 37, n. 5, p. 365-366. June/July 2013.

PAULSON, D. L.; RICCARDI, C. M.; BEAUSOLEIL, C. M.; FENDLER, E. J.; DOLAN, M. J.; DUNKERTON, R. V.; WILLIAMS, R. A. Efficacy evaluation of four hand cleansing regimens for food handlers. **Dairy ,Food and Environmental Sanitation**, Ames, v. 19, n. 10, p. 680-684. Oct. 1999.

PENNA, T. C. V.; MAZZOLA, P. G.; MARTINS, A. M. S. The efficacy of chemical agents in cleaning and disinfection programs. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 1, n. 16, p. 1-16. Sep. 2001.

POERNER, N.; RODRIGUES, E.; PALHANO, A. L.; FIORENTINI, A. M. Avaliação das condições higiênico-sanitárias em serviços de alimentação. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 68, n. 3, p. 399-405. Mar. 2009.

REYBROUCK, G. The assessment of the bactericidal activity of surface disinfectants. V. Correlation of the tests with practice. **International journal of hygiene and environmental medicine**, Des Moines, v.192 , n.5, p. 438-446. Aug. 1992.

REYBROUCK, G. International standardization of disinfectant testing: is it possible?. **The Journal of hospital infection**, v.18, supplA, p. 280 -288, 1991.

RUTALA, W.A.; COLE, E.C. Ineffectiveness of hospital disinfectants against bacteria: A collaborative study. **InfectionControl**, v.8, n.12, p.501 – 506, 1987.

SANTOS, M. G.; VIEIRA, R. H. S. F.; IARIA, S. T.; SOUSA, O. V. Coliformes isolados de utensílios e equipamentos, na linha de processamento de camarão, de uma indústria de pescado de Fortaleza-CE. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 16, n. 101, p. 67-75, out. 2002.

SCHERER, R.; DANIEL, A. P.; AUGUSTI, P. R.; LAZZARI, R.; LIMA, R. L.; FRIES, L. L. M.; RADUNZ-NETO, J.; EMANUELLI, T. Efeito do gelo clorado sobre parâmetros químicos e microbiológicos da carne de carpa capim (*Ctenopharyn godonidella*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 24, n. 4, p. 680-684, out./dez. 2004.

SCHNEIDER, S; KRÜLLS-MÜNCH, J.; KNÖRIG, J. A mycotic aneurysm of the ascending aorta and aortic arch induced by *Salmonella* Enteritis. **Zeitschrift Fur Kardiologie**, Darmstad, v.99, n.12, p.964 –7, Dec. 2004

SFA-CE Superintendência Federal de Agricultura no estado do Ceará . Serviço de Inspeção Federal(SIF) . Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2012.

SILVA, N.; SILVEIRA, N. F. A.; YOKOYA, F.; OKAZAKI, M. M. Ocorrência de *Escherichia coli*O157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. 2, p. 167-173, maio/ago. 2003.

SIMMONDS, C.K; LAMPRECHT, E.C. South African fishing industry research Institute **Annual Report**, n.34, p.88-91, 1980.

SOUSA, C. L.; FREITAS, J. A.; LOURENÇO, L. F. H.; ARAÚJO, E. A. F.; SOUZA, J. N. S. Avaliação da qualidade microbiológica no processamento de pescados. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 151-157. Abr-Jun. 2011.

SPRINGTHORPE, V.S.; SATTAR, S.A. Carrier tests to asses microbicidal activities of chemical disinfectants for use on medical devises and environmental surfaces. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v.88 n.1, p.182- 201, Jan. 2005.

SREBERNICH, S. M. Utilização do dióxido de cloro e do ácido peracético como substitutos do hipoclorito de sódio na sanitização do cheiro-verde minimamente processado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 744-750. Out-Dez. 2007.

TEIXEIRA, K. S. S.; DAHER, G. L.; OLIVEIRA, A. S. A. E. Avaliação da ação antimicrobiana de desinfetantes utilizados em uma indústria químico – farmacêutica. **Faça Saúde**, Fortaleza, v. 1, n. 1, p. 23-29. Out. 2012.

TIMENETSKY, J. Avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes químicos, **Revista Laes & Haes**, São Paulo, v. 23, n.136, p. 134 -142, abril/maio, 2002

TIMENETSKY, J. Avaliação microbiológica de desinfetantes químicos de uso doméstico, **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.24. n.1, p. 47 – 50, 1990

TIMENETSKY, J.; ALTERTHUM, F. Coeficiente fenólico na avaliação microbiológica de desinfetantes de uso hospitalar e doméstico. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 170-174. Abr. 1989.

TIMENETSKY, J.; YANAGUITA, R. M.; SILVA, L. A. Avaliação de desinfetantes químicos de uso doméstico contra *Vibrio cholerae* El Tor (amostra não toxigênica). **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 328-331. Out. 1992.

TODD, E. C. D.; GREIG, J. D.; BARTLESON, C. A.; MICHAELS, B. S. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 1, p. 202-219, Jan. 2009.

TOMASINO, S. Disinfectants. In: _____. **Official methods of analyses**, 18. ed. Revision 2. Gaithersburg: Association Official Analytical Chemists, 2007. cap. 6.

TOMASINO, S. F.; FIUMARA, R. M.; COTTRILL, M. P. Enumeration procedure for monitoring test microbe populations on inoculated carriers in AOAC use-dilution methods. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 89, n. 6, p. 1629-1634, Nov./Dec. 2006.

TOMASINO, S. F.; HAMILTON, M.A. Modification to the AOAC sporicidal activity of disinfectants test (Method 966.04): collaborative study., **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 89, n. 5, p. 1373 - 97, Sep.-Oct., 2006.

TOMASINO, S.F; SAMALOT-FREIRE, L.C. AOAC Method 966.04: Preliminary evaluation of cooked meat medium with manganese sulfate for the cultivation of *Clostridium sporogenes*: Precol laborative study. **Journal of AOAC International**, Gaithersburg , v. 90, n.3, p. 825-833, May. 2007.

TOMASINO, S.F. General Referee Reports: **Journal of AOAC International**. Gaithersburg, v.88, n.1, p.355- 58, 2005.

TOMASINO, S.F; PINES, R.M; HAMILTON, M. AImproving the AOAC Use-Dilution Method by Establishing a Minimum Log Density Value for Test Microbes on Inoculated Carriers **Journal of AOAC International**, Gaithersburg v. 92, n.5, p. 1531-1540, Sept. 2009.

TOMASINO, S.F.; PINES, R.M.; HAMILTON, O. Procedural Revision to the Use-Dilution Methods: Establishment of Maximum Log Density Value for Test Microbes on Inoculated Carriers. . **Journal of AOAC International**, Gaithersburg, v. 95, n.4, p. 1059 -1063, Jul./Aug., 2012.

VARGAS, D.S.T.; QUINTAES, K.D. Potencial perigo microbiológico de caixas plásticas tipo monobloco, no armazenamento e transporte de pescados em São Paulo. **Ciência Tecnologia Alimentos**, São Paulo, v.23, n.3, p. 517-522, Set./Dez. 2003.

VIEIRA, K. V. M.; MAIA, D. C. C.; JANEIRO, D. I.; VIEIRA, R. H. F.; CEBALLOS, B. S. O. Influência das condições higiênico-sanitárias no processo de beneficiamento de tilápias (*Oreochromis niloticus*) em filés congelados. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 14, n. 74, p. 37-40, jul. 2000.

VIEIRA, R.H.S.F.V. ; VIEIRA, G.H.F; ROCHA, C.A.S.; SAKER, S.A.; SAMPAIO, A.H. Estudo organoléptico e bacteriológico de caudas de lagosta estocadas em gelo. **Arquivos de Ciências do mar**, Fortaleza, v.25, n. 1 e 2, p. 63 - 75, 1986.

VIEIRA, R.H.S.F.V. ;TÔRRES, R.C.O., Contagem Padrão em Placas (CPP) de micro-organismos aeróbios viáveisIn: VIEIRA, R.H.S.F.V. **Microbiologia, higiene e qualidade do pescado: teoria e prática** ,São Paulo: Varela. p.211 – 217, 2004.

ZHANG, G. D.; MA, L.; PHELAN, V. H.; DOYLE, M. P. Efficacy of antimicrobial agents in lettuce leaf processing water for control of *Escherichia coli* O157:H7. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 72, n. 7, p. 1392-1397, July 2009.