

Avaliação da eficiência de diferentes agentes de limpeza utilizados na indústria de alimentos

Efficiency evaluation of different cleaning agents used on food industry

DOI:10.34117/bjdv7n12-662

Recebimento dos originais: 12/11/2021

Aceitação para publicação: 26/12/2021

Liandra Palmorio

Cientista de Alimentos

Universidade Federal de Santa Catarina

Rodovia Admar Gonzaga, 1346 – Itacorubi. Florianópolis, SC, CEP 88034-001

E-mail: li.palmorio@gmail.com

Francie Nara Gaio

Cientista de Alimentos

Universidade Federal de Santa Catarina

Rodovia Admar Gonzaga, 1346 – Itacorubi. Florianópolis, SC, CEP 88034-001

E-mail: franciegaio@gmail.com

Deise Helena Baggio Ribeiro

Doutora em Ciências – Universidade de São Paulo

Universidade Federal de Santa Catarina

Centro de Ciências Agrárias – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos

Rodovia Admar Gonzaga, 1346 – Itacorubi. Florianópolis, SC, CEP 88034-001

E-mail: deise.baggio@ufsc.br

RESUMO

A segurança dos alimentos exige uma série de cuidados que incluem a higienização dos equipamentos e utensílios de forma correta e com frequência capaz de garantir condições sanitárias e minimizar o risco de contaminação. Este controle pode ser feito através da utilização de métodos químicos com diferentes formulações e formas de ação, por isso a escolha deve levar em consideração a matriz alimentar na qual irá atuar e o tipo de superfície a ser higienizada. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de diferentes agentes de limpeza, utilizados pela indústria de alimentos, aplicados em três concentrações distintas, quando em contato com oito micro-organismos deteriorantes e patogênicos. Os produtos testados foram detergentes alcalinos e neutros, desinfetantes a base de quaternário de amônio, biguanida e alcalinos e os testes realizados por meio de Difusão em Ágar e Inibição do Crescimento Microbiano em Superfície de Aço Inoxidável. A maioria dos produtos apresentou resultados positivos para inibição do crescimento microbiano, sendo as concentrações recomendadas pelo fabricante as mais eficientes. No entanto, ao avaliar a eficiências na inibição do *Bacillus subtilis* em superfícies de aço inoxidável 50% deles não foram capazes de inibir o crescimento deste micro-organismo, nestas condições. Este estudo aponta para a importância da escolha dos

agentes de limpeza que são destinados à higienização das indústrias de alimentos, as quais possuem uma grande diversidade de micro-organismos deteriorantes e patogênicos que implicam na segurança alimentar e que neste trabalho se mostraram resistentes a grande parte dos agentes estudados.

Palavras-chave: Detergentes, Sanitizantes, Higienização, *Bacillus subtilis*.

ABSTRACT

Ensuring food safety requires a series of precautions that include correct cleaning steps of equipment and utensils with a frequency capable of assure appropriate hygienic-sanitary conditions and minimizing the risk of contamination. This control can be done by using chemical methods with different formulations and forms of action. The choice must take into account the food matrix in which it will act and the type of surface to be sanitized. The objective of this work was to verify the efficiency of different cleaning agents, used by the food industry, applied in three distinct concentrations when in contact with eight spoiling and pathogenic microorganisms. The tested cleaning agents were alkaline and neutral detergents, disinfectants based on quaternary ammonium, biguanide and alkaline. The analysis was carried out by Agar Diffusion and Inhibition of Microbial Growth in Stainless Steel Surface. Most of the tested agents showed positive results for inhibition of microbial growth, at concentrations recommended by the manufacturer seems to be the most efficient. However, when evaluating the efficiency of these agents in the inhibition of *Bacillus subtilis* on stainless steel surfaces, 50% of them were not able to inhibit the growth of this microorganism under these conditions. It is highlighted the importance of choosing the cleaning agents used in the food industries, once it has a great diversity of spoilage and pathogenic microorganisms that imply food safety and, in this work, they were resistant to a most of the agents studied.

Keywords: Detergents, Sanitizers, Sanitation, *Bacillus subtilis*.

1 INTRODUÇÃO

Muitos micro-organismos fazem parte da microbiota normal dos alimentos. Eles podem ser oriundos de diversas fontes, como o solo ou a água, por isso são facilmente transferidos para o alimento no processo produtivo, podendo causar grandes perdas devido sua capacidade deteriorante ou sua patogenicidade (GAVA, SILVA e FRIAS, 2008).

Algumas das principais bactérias e leveduras encontradas em alimentos são: *Escherichia coli*, um indicador de contaminação fecal; *Salmonella sp.*, indicador de segurança do consumo; *Pseudomonas sp.*, deteriorante presente em alimentos como vegetais, frutas, leite, solo e água; *Staphylococcus aureus* encontrado na cavidade nasal de indivíduos; *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* que encontram-se distribuídos pelo ambiente, além de serem frequentemente encontrados em cereais e grãos e *Candida sp*,

deteriorante, encontrada predominante na pele e mucosas e ambiente em geral (SILVA JUNIOR, 1995).

Para evitar a contaminação na indústria e o recolhimento dos alimentos, medidas de segurança devem ser adotadas e incluem os procedimentos de higienização cujas etapas fundamentais, independente do método ser manual ou mecânico, são pré-lavagem, aplicação dos detergentes, enxágue e sanitização (ANDRADE, 2008).

A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, constituídos principalmente por carboidratos, proteínas, gordura e sais minerais. Neste sentido, a etapa de pré-lavagem é realizada com água e é responsável pela remoção da sujidade mais grosseira (GAVA, SILVA e FRIAS, 2008). Na etapa de aplicação de detergentes é importante ter conhecimento sobre a natureza do produto e de suas condições de uso, uma vez que este irá interagir com as sujidades, cujas características que podem diminuir a eficiência do detergente (SILVA JUNIOR, 1995).

Na etapa de enxágue os resíduos do detergente utilizado são removidos, enquanto a sanitização tem como objetivo eliminar micro-organismos patogênicos e reduzir o número de micro-organismos deteriorantes para níveis considerados seguros (ANDRADE, 2008). A água utilizada tanto na lavagem como também no processamento, deve ser de boa qualidade e dependendo da sua utilização, ter características específicas de potabilidade, dureza, teor de metais tóxicos, contagem microbiana, ausência de odor e sabor (GAVA, SILVA e FRIAS, 2008).

O processo de higienização dos equipamentos e utensílios que deve ser realizado de forma correta e com uma frequência capaz de garantir condições higiênico-sanitárias apropriadas e minimizar o risco de contaminação. Há muitos agentes de limpeza disponíveis para serem utilizados pela indústria de alimentos com diferentes formulações e formas de ação, por isso sua escolha deve levar em consideração a matriz alimentar na qual irá atuar, além de seguir as recomendações do tempo de ação e a concentração necessária, para garantir eficiência do processo (ANDRADE, 2008).

Com isso, o objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência de três concentrações distintas de agentes de limpeza comerciais utilizados pela indústria de alimentos, sendo detergentes alcalinos e neutros e de desinfetantes a base de quaternário de amônio, biguanida e hipoclorito de sódio, no controle dos micro-organismos: *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhimurium*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além de avaliar se a menor concentração

testada, de cada um dos agentes de limpeza, foi capaz de inibir o crescimento de micro-organismos em superfícies de aço inoxidável contaminadas com *Bacillus subtilis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICROORGANISMOS

As cepas *Bacillus subtilis* ATCC - CCGB 0122 [LFB-FIOCRUZ 122], *Bacillus subtilis* CCGB 0030 [LFB-FIOCRUZ 30] *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Candida albicans* ATCC, da Coleção de Culturas de Bactérias de Interesse em Saúde, da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Para a preparação da cultura experimental, as cepas foram ativadas em caldo BHI por 24h a 35°C, em seguida foram diluídas em água peptonada 0,1% para a obtenção da concentração equivalente ao padrão 0,5 da escala McFarland.

2.2 AGENTES DE LIMPEZA:

Os agentes de limpeza utilizados foram codificados para manter o anonimato das marcas, os designados como desinfetantes receberam o código A seguido por uma numeração para diferenciá-los, já os detergentes receberam o código B também seguido por uma numeração.

As concentrações dos agentes de limpeza comerciais estudados foram estipuladas a partir da diluição sugerida pelo fabricante, a qual foi nomeada como concentração X, além disso, foram testadas a metade e o dobro da concentração sugerida (X/2 e 2X), como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Codificação e concentração dos agentes de limpeza.

Agente de limpeza	Código	Concentração recomendada (X) (µL/mL)	Concentração X/2 (µL/mL)	Concentração 2X (µL/mL)
Desinfetante (alcalino)	A1	10	5	20
Desinfetante (alcalino)	A2	5	2,5	10
Desinfetante (quaternário de amônio)	A3	50	25	100
Desinfetante (quaternário de amônio)	A4	10	5	20
Desinfetante (quaternário de amônio)	A5	5	2,5	10
Desinfetante (biguanida)	A6	20	10	40
Detergente (alcalino)	B1	uso direto	-	-
Detergente (neutro)	B2	10	5	20
Detergente (alcalino)	B3	30	15	60

2.3 CILINDROS DE AÇO INOXIDÁVEL

Utilizou-se cilindros, com diâmetro de 3,2 cm, de aço inoxidável 304 (18%Cr e 8%Ni) da família dos aços austeníticos, apresentando excelente resistência a corrosão, ductilidade e soldabilidade (CARBÓ, 2008).

2.4 TESTE DE DIFUSÃO EM ÁGAR

O teste de difusão em ágar tem como objetivo avaliar o potencial inibitório dos agentes de limpeza utilizados. Para isso, ágar Müller Hinton foi inoculado por espalhamento superficial com as cepas mencionadas e em seguida foram aplicados discos de papel impregnados com: concentração X, concentração X/2 e concentração 2X dos agentes de limpeza, além de ciprofloxacino (0,05 µL/mL) e água estéril como controles positivo e negativo, respectivamente. Após a colocação dos discos, as placas foram incubadas aerobicamente a 35°C/24h para posterior medição dos halos formados.

2.5 TESTE DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL

Devido os resultados preliminares obtidos por difusão em ágar, optou-se por avaliar o efeito dos agentes de limpeza A3, A4, A5 e B1, frente ao *Bacillus subtilis* ATCC CCGB 0122 em superfície de aço inoxidável.

A metodologia empregada foi baseada nas estabelecidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS 633.210.007) (CÉLIA ROMÃO, 2018) e pelo Comitê Europeu de Normalização (CEN 13697-2001). Foram depositados três cilindros de aço inoxidável estéreis em suspensões bacterianas de *Bacillus subtilis*, nas concentrações 10^3 , 10^4 e 10^5 UFC/mL, durante uma hora. Em seguida, os cilindros foram retirados da suspensão e acondicionados em placas de Petri estéreis até sua completa secagem em capela de fluxo laminar a temperatura ambiente por 24h.

Os cilindros foram mantidos, por dez minutos, em contato com as soluções dos desinfetantes A3, A4 e A5 nas concentrações X/2 e do detergente B1 na concentração de X. Em seguida, foram transferidos para frascos contendo Caldo Nutriente por quarenta minutos, em seguida para uma segunda subcultura do mesmo caldo e incubados a 35°C/48h.

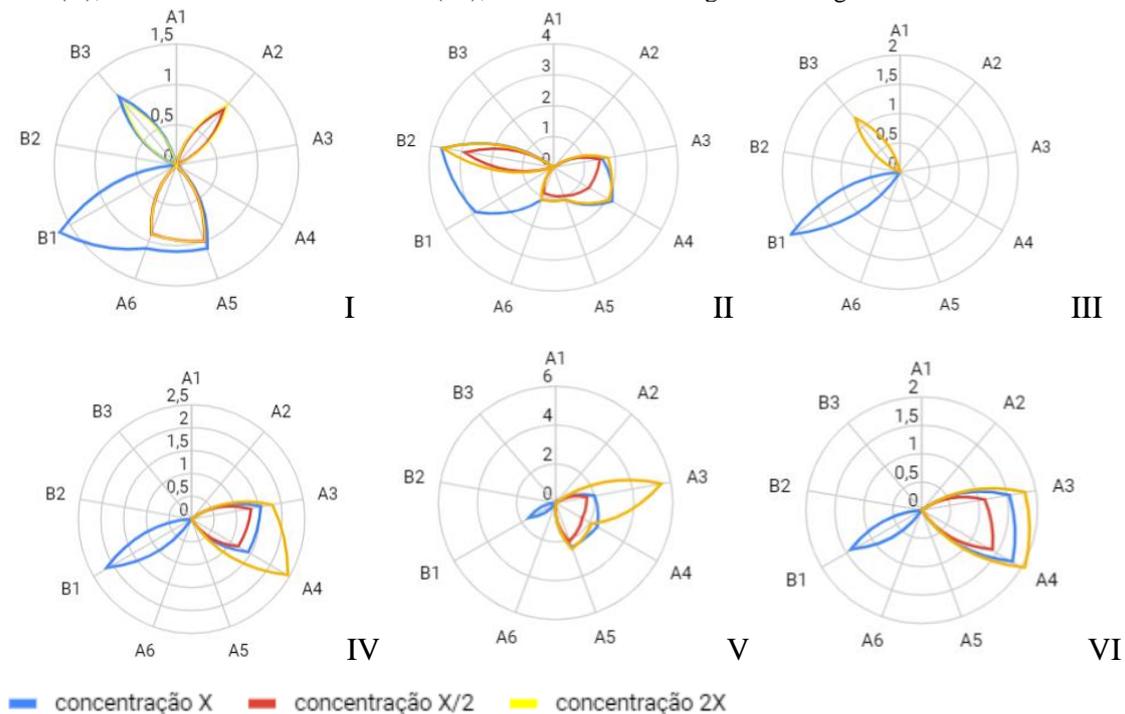
Uma alíquota de 100 µL de cada suspensão foi semeada em placas contendo Ágar Padrão de Contagem (PCA) para a contagem das colônias. Foi utilizado como critério de aceitabilidade a redução de 5 log (99,999%) na contagem de bactérias.

3 RESULTADOS

3.1 TESTE DIFUSÃO EM ÁGAR:

Em relação a *Salmonella Typhimurium*, os agentes de limpeza A1, A3, A4 e B2 não foram efetivos no controle do seu crescimento, não apresentando formação de halo para as concentrações utilizadas. Entre os agentes de limpeza A2, A5, A6, B1 e B3 o maior halo de inibição foi observado na concentração X. Os agentes A5, A6, B1 e B3 apresentaram halos com diâmetro superior a 1cm quando aplicados nesta concentração e halos de diâmetro inferior nas demais, indicando que a concentração recomendada pelos fabricantes apresentou a melhor eficiência entre as testadas neste estudo, como apresentado na Figura 1.

Figura 1: Representação gráfica da medida dos halos de inibição (cm) de *Salmonella Typhimurium* (I), *Staphylococcus aureus* (II), *Candida albicans* (III), *Bacillus cereus* (IV), *Bacillus subtilis* ATCC CCGB 0122 (V), *Bacillus subtilis* CCGB 0030 (VI), frente a diferentes agentes detergentes e desinfetantes.



* A1 e A2 Desinfetante (alcalino); A3, A4 e A5 Desinfetante (quaternário de amônio); A6 Desinfetante (biguanida); B1 e B3 Detergente (alcalino); B2 Detergente (neutro).

Os agentes de limpeza A1, A2 e B3, testados na bactéria *S. aureus* não foram efetivos no controle do seu crescimento, não apresentando formação de halo para as concentrações utilizadas. Entre os agentes de limpeza A3, A4, A5, A6, B1 e B2 houve formação de halos de inibição com diâmetro semelhante e superior a 1cm nas concentrações X e 2X, exceto para o agente B1 de uso direto, mostrando que para este

micro-organismo não há ganho de eficiência com a aplicação de concentrações acima daquelas estabelecidas pelo fabricante.

Os agentes de limpeza A1, A2, A5, A6, B2 e B3 A1, nas concentrações estudadas, não foram efetivos no controle do seu crescimento do *B. cereus* e *B. subtilis* CCGB 0030. Entre os agentes de limpeza A3, A4 e B1 a concentração que apresentou maior halo de inibição para o crescimento do *B. cereus* foi a concentração 2X do desinfetante A4. No entanto, também foi observada efetividade nas concentrações sugeridas pelo fabricante, com halos de diâmetro superiores a 1 cm. No controle do *B. subtilis* ATCC CCGB 0122, o agente A5 apresentou resultados positivos juntamente com A3, A4 e B1. Contudo, o *B. subtilis* de origem ambiental não foi sensível a ação do agente A5.

A. C. albicans não foi inibida pela maioria dos agentes de limpeza estudados. Não foi observado evidências no controle desta levedura com o emprego dos agentes de limpeza A1, A2, A3, A4, A5, A6 e B2, nas concentrações utilizadas. O agente B1 apresentou halo de inibição acima de 2 cm de diâmetro, enquanto o B3 foi efetivo apenas para a concentração 2X.

As bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa* não foram inibidas no teste de difusão em ágar nas condições estudadas.

A maioria dos agentes testados apresentou resultados positivos para mais de um micro-organismo, com exceção do agente A1 que se mostrou incapaz de inibir o crescimento dos micro-organismos testados, mesmo quando aplicado em concentrações acima da estabelecida pelo fabricante (2X). Enquanto os agentes A2 e B2 foram capazes de inibir o crescimento de apenas um dos oito micro-organismos testados, como apresentado na Tabela 2. Quimicamente, os agentes A1 e A2 são desinfetantes alcalinos e o B2 é detergente neutro, sugerindo que para estes não são os compostos ideais para a inibição dos micro-organismos estudados.

Entre os agentes de limpeza que tiveram um desempenho considerado intermediário, apresentando de 2 a 3 resultados positivos estão A5, A6 e B3. Já os classificados como tendo resultado satisfatório com mais de 3 resultados positivos, estão A3, A4 e B1.

Para o A3, a concentração 2X apresentou a maior eficiência, com formação de halo de diâmetro superior às demais concentrações utilizadas. O agente A4 se apresentou eficiente tanto na concentração X como na 2X, mostrando que não há ganho de eficiência com o aumento de sua concentração. Para o B1 os estudos realizados utilizaram apenas a

concentração X sugerida pelo fabricante (uso direto), que se mostrou eficiente na inibição da maioria dos micro-organismos estudados.

Tabela 2. Resultado da eficiência dos agentes de limpeza para cada micro-organismo.

Micro-organismo	Agentes de limpeza								
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3
<i>Salmonella Typhimurium</i>	-	+	-	-	+	+	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	+	+	+	+	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> CCGB 0030	-	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC CCGB 122	-	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>Candida albicans</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

3.2 TESTE CRESCIMENTO MICROBIANO EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL

Os detergentes A3 e A4 se mostraram eficientes no controle do desenvolvimento da cepa de referência de *B. Subtilis* ATCC CCGB 0122, pois houve ausência de crescimento nas placas de aço inoxidável após a impregnação das bactérias por 24h. Este resultado indica que estes agentes de limpeza são eficientes na eliminação de células planctônicas deste micro-organismo quando em superfície de aço inoxidável.

No entanto, foi obtida a contagem superior a 5 log (UFC/mL) para o desinfetante A5 e o detergente B1, indicando que não houve inibição deste micro-organismo em superfície de aço inoxidável, diferentemente do resultado obtido na inibição das células livres.

4 DISCUSSÃO

4.1 TESTE DIFUSÃO EM ÁGAR:

Em relação a inibição do crescimento da *Salmonella Typhimurium*, apenas os detergentes de caráter alcalino apresentaram resultados positivos. Já entre os desinfetantes foi observada efetividade para os alcalinos, a base de quaternário de amônio e a base de biguanida. Compostos clorados são altamente eficazes contra micro-organismos Gram negativos, o que explica um halo com diâmetro acima de 1,5cm para o agente B1 e acima de 1cm para o B3, já compostos a base de quaternário de amônio são classificados como tendo baixa eficácia contra bactérias Gram negativas (ANDRADE, 2008), por isso os resultados foram positivos apenas para um dos três desinfetantes com esta característica.

Apesar da *Salmonella Typhimurium* ter um mecanismo de controle contra o estresse ácido, com pH de 3,0 - 4,0, não podemos afirmar o mesmo para meios básicos (KEERTHIRATHNE, et al 2016). Há relatos de que a *Salmonella* Enteritidis foi capaz de se desenvolver em água utilizada para lavagem de ovos com pH 9,0 e a diminuição do número de células só foi observada com pH acima de 10,5 (CATALANO e KNABEL, 1994).

Os compostos alcalino clorados se mostraram mais eficientes nos testes para *Salmonella spp.* em suspensão e apresentaram os melhores resultados para a inativação de biofilmes deste micro-organismo (ZIECH, et al, 2016), reforçando o resultado obtido para o teste de difusão em ágar que inibiu o crescimento da *Salmonella Typhimurium* em três dos quatro agentes alcalinos testados. Os agentes de limpeza utilizados atuam na faixa de pH 8,0 - 14,0, a causa da inibição microbiana possivelmente foi através de mecanismos de desnaturação de proteínas, inibição da captação de oxigênio, inativação de enzimas (ANDRADE, 2008).

No controle de *S. aureus*, os detergentes que demonstraram melhor efeito foram os de caráter alcalino e neutro, já dentre os desinfetantes obteve-se resultados positivos para aqueles a base de quaternário de amônio e de biguanida.

É esperada a eficiência dos desinfetantes a base de quaternário de amônio frente a *S. aureus*, uma vez que por seu mecanismo de ação, inibem bactérias Gram positivas (CHAN, et al, 2018). Neste estudo, os quatro compostos com esta base foram efetivos no controle deste micro-organismo. Da mesma forma, o desinfetante a base de biguanida, que é capaz de inibir tanto bactérias Gram positivas como Gram negativas, este resultado positivo era esperado, ainda mais por sua atuação em uma faixa de pH entre pH 9,0 a pH 10,0 que não privilegia o desenvolvimento do *S. aureus* (FRANZIN, 2009).

Dois entre os quatro agentes alcalinos clorados testados não foram efetivos na inibição de *S. aureus*, apesar de serem classificados como desinfetantes. Segundo a RDC nº 14/2007, desinfetantes devem ter sua atividade antimicrobiana comprovada frente a *S. aureus* na concentração sugerida pelo fabricante (BRASIL, 2007). Neste estudo não foi o efeito esperado não foi comprovado, uma vez que não houve halo de inibição nas placas inoculadas.

Os desinfetantes a base de quaternário de amônio são altamente eficazes contra bactérias Gram positivas e micro-organismos termodúricos, como é o caso do *Bacillus spp* (ANDRADE, 2008). Atuam em meio alcalino, mas em uma ampla faixa de pH que pode variar de acordo com o fabricante, uma de suas formas de atuação é através da

adsorção na parede celular, causando desorganização da membrana e vazamento do material intracelular e conseqüentemente morte da célula (GAVA, SILVA e FRIAS, 2008; SILVA JUNIOR, 1995; ANDRADE, 2008). Os agentes A3 e A4 são compostos a base de quaternário de amônio, seu mecanismo de ação explica a formação do halo de inibição do *B. cereus* por dois dos três agentes com esta composição.

Em relação à composição química do agente B1, composta por hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio, que atuam em uma faixa de pH de 12,5 a pH 13,5 desfavorável para desenvolvimento do *B. cereus* que se desenvolve bem em pH próximo ao neutro.

Estudos anteriores mostraram que células desta bactéria em estado planctônico, quando tratadas com 25 ppm de hipoclorito ou 100 ppm de um agente a base de quaternário de amônio, apresentam uma redução de mais de 5,0 log UFC/mL do número de células com uma exposição de 15 segundos. No entanto, mostrou pouco efeito sobre as células em biofilme, mesmo quando o tempo de exposição foi estendido para 5 min (PENG, TSAI e CHOU, 2002). Neste estudo, o agente B1, também inibiu o crescimento para o *B. cereus*. Porém não foi possível comparar os resultados, uma vez que a ficha técnica disponibilizada pelo fabricante indica apenas um percentual <5% de cada substância utilizada em sua formulação, impossibilitando saber sua concentração exata.

Em relação ao *B. subtilis*, foi observado que entre os desinfetantes, apenas os que constituem em sua formulação o composto químico quaternário de amônio apresentaram resultados positivos, exibindo crescimento de halo com o aumento da concentração, exceto o agente A4 na cepa de referência, que na concentração 2X exibiu halo menor ao formado pela concentração X.

Os halos formados para o *B. subtilis* ATCC CCGB 0122 apresentam diâmetro maior que aqueles formados no *B. subtilis* CCGB 0030. No mesmo sentido o agente A5 também apresentou resultados positivos para a cepa referência e não inibiu a cepa selvagem. Uma hipótese para tal ocorrido pode estar no desenvolvimento de adaptação e resistência da cepa de origem ambiental, isolada do solo, frente aos agentes de limpeza utilizados. Sabe-se que bactérias presentes no ambiente estão expostas a intempéries, a níveis diferentes de radiação, alteração no suprimento de nutrientes, de concentração de oxigênio, de presença de substâncias tóxicas e de outras bactérias, além das demais influências externas que com o passar do tempo induzem o desenvolvimento de mecanismos de defesa, tornando-a mais resistente.

O uso do B1 é indicado sem diluição, este fator pode ter sido o responsável pela inibição, apesar do *B. subtilis* se manter estável em um intervalo de pH 6,0 - 9,0, é ser

capaz de manter a homeostase citoplasmática em pH 7,3 a pH 7,6 durante o crescimento vegetativo (WILKS, et al, 2008). Foi evidenciado que uma solução de 0,4% de hipoclorito de sódio foi capaz de causar uma redução de 2 a 3 log de oito cepas selvagens testadas e de uma cepa de referência de *Bacillus subtilis* de referência, após uma exposição de 30 minutos (MAZZOLA, MARTINS e PENNA, 2006).

Existem poucos estudos sobre a eficácia de sanitizantes quando testados com a *Candida albicans*, no entanto, os testes de difusão em ágar mostraram que os agentes alcalinos são as substâncias mais promissoras para sua inibição. Tanto B1 quanto B3 são detergentes alcalinos que atuam em uma faixa que varia de pH 12,0 a pH 14,0, uma vez que leveduras do gênero *Candida sp.* desenvolvem-se bem em meio ácido, é possível que a alteração para pH extremamente alcalino seja capaz de causar danos como desnaturação proteica, inativação de enzimas e até alterações na membrana, levando à morte da célula (ANDRADE, 2008).

Entre todos os micro-organismos testados, os que mostraram ser de controle crítico foram *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, que não foram inibidos por nenhum dos agentes de limpeza estudados. Apesar dos agentes de limpeza, empregados neste estudo, apresentarem em seus rótulos a alegação de inibição de *E. coli*, os resultados foram negativos para todas as concentrações e condições testadas. É importante salientar que sua presença em alimentos indica falta de segurança e qualidade, respectivamente. Além disso, é mandatório que para qualquer substância ser classificada como desinfetante deve apresentar evidências de inibição de *Escherichia coli* (KEERTHIRATHNE, et,al 2016).

Várias cepas de *E. coli* são importantes patógenos veiculados por alimentos, sendo frequentemente associadas a surtos graves. Além disso, estudos indicam que células planctônicas são mais suscetíveis aos agentes de limpeza do que as células de biofilme (WANG, et al, 2012). Neste sentido, a não inibição deste micro-organismo no teste de difusão em ágar é preocupante, uma vez que neste estudo não foi induzida a formação de biofilme, uma vez que nesta condição seriam ainda mais resistentes e de difícil controle.

A densidade celular de biofilmes formados pela bactéria *E. coli* tiveram redução de 1,0 e 2,0 Log (UFC/mL) após exposição de 2 e 10 minutos respectivamente, a um agente a base de quaternário de amônio na concentração de 300 ppm¹⁶. Esta concentração, quando comparada com a maior concentração utilizada neste trabalho, representa três vezes mais do que aplicada para o agente A3, quinze vezes mais do que para o agente A4

e trinta vezes mais do que a aplicada para o agente A5, que já representavam o dobro do recomendado pelo fabricante.

Na avaliação de desinfetante a base de hipoclorito de sódio na concentração de 200 ppm, foi observada redução de células de 2,0 a 3,0 Log (UFC/mL) após uma exposição de 2 min e redução de 3,0 a 4,0 Log (UFC/mL) quando expostos durante 10 min (WANG, et al, 2012). Contudo, neste estudo, as maiores concentrações utilizadas, o dobro das estabelecidas pelos fabricantes, foi muito inferior àquelas relatadas como eficientes, podendo indicar que para a inibição deste micro-organismo, a recomendação do fabricante não é eficaz e que concentrações maiores são requeridas.

Várias espécies de *Pseudomonas*, inclusive da *P. aeruginosa* apresentaram redução de até 1,5 log (UFC/mL) com soluções de 0,4% de hipoclorito de sódio e de 0,5% de hidróxido de sódio que após 9 minutos de exposição (MAZZOLA, MARTINS e PENNA, 2006). Apesar dos agentes A1 e B1 possuírem em sua composição as substâncias hipoclorito de sódio e hidróxido de sódio, não foram eficientes nas condições de estudo descritas. Além disso, *P. aeruginosa* tem grande habilidade de formar biofilmes e produzir uma mistura de polissacarídeos que dificultam a atuação dos agentes de limpeza dificultado sua chegada até a célula bacteriana, tornando esse micro-organismos mais resistente (MA, et al, 2009). O que justifica a preocupação com a importância da eficiência dos agentes de limpeza nas concentrações propostas pelos fabricantes.

4.2 TESTE CRESCIMENTO MICROBIANO EM SUPERFÍCIE DE AÇO INOXIDÁVEL

Neste estudo, foi observada a sobrevivência de *B. subtilis* aderido em superfícies de aço inoxidável tratada com agentes de limpeza que se mostraram eficiente no controle do seu desenvolvimento no teste de difusão em ágar, sugerindo que esta bactéria tem sua resistência alterada de acordo com o ambiente na qual se encontra. O sanitizante peróxido de hidrogênio foi o mais eficaz contra as células planctônicas do *B. subtilis*.

O *Bacillus subtilis* é conhecido por sua capacidade de produção de exopolissacarídeos, polímeros que podem aderir a diferentes superfícies, incluindo o aço inoxidável. Em um estudo com diferentes sanitizantes comerciais, tanto em células sésseis como em planctônicas em superfícies de aço inoxidável e poliuretano com os micro-organismos *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens*, observaram que as células sésseis ficam menos suscetíveis aos sanitizantes do que as planctônicas (LINDSAY e VON HOLY, et al, 1999).

Outro fator a respeito de bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* é a sua capacidade de produzir esporos, uma célula diferenciada e não replicativa, mais resistente às condições adversas, que consegue germinar quando se encontra em um meio que forneça condições adequadas para seu desenvolvimento (RABINOVITCH e OLIVEIRA, 2015). Neste sentido, a metodologia empregada que promove a exposição aos agentes de limpeza seguido por incubação em um meio de cultura com nutrientes, temperatura e condições aeróbicas adequadas podem ter induzido a germinação dos esporos e estimulado o crescimento das células vegetativas, culminando nos resultados obtidos para os produtos B1 e A5.

Cabe salientar, a preocupação com a sobrevivência desta bactéria na superfície estudada, sua característica de formadora de biofilme, que atuam como proteção contra os agentes de limpeza, tornando mais difícil a remoção deste e de outros micro-organismos ali presentes.

5 CONCLUSÃO

A análise de eficiência dos agentes de limpeza utilizados neste estudo, mostraram que a inibição do crescimento microbiano depende das características do agente de limpeza empregado e do micro-organismo. Para os agentes que se mostraram capazes de inibir um maior número de micro-organismos as concentrações mais eficientes foram X e 2X. Dois entre os quatro agentes de limpeza capazes de inibir o crescimento microbiano do *Bacillus subtilis* por difusão em ágar não foram eficientes na sua inibição em superfície de aço inoxidável.

Este estudo aponta para a necessidade de que os órgãos competentes revisem a forma de avaliação da eficiência dos agentes de limpeza que são destinados à higienização das indústrias de alimentos, as quais possuem uma grande diversidade de micro-organismos deteriorantes e patogênicos que implicam na segurança dos alimentos e que neste trabalho se mostraram resistentes a grande parte, senão a todos, os agentes estudados.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, Nélío José de. **Higiene na Indústria de Alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**. São Paulo: Livraria Varela, 2008. 412 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução nº 14, de 28 de fevereiro de 2007. **Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, D.F., 2007.

CARBÓ, H. M. **Aços Inoxidáveis: Aplicações e Especificações**. ARCELORMITTAL INOX, 2008.

CATALANO, Clairellen R.; KNABEL, Stephen J.. Destruction of Salmonella enteritidis by High pH and Rapid Chilling During Simulated Commercial Egg Processing. **Journal Of Food Protection**, [s.l.], v. 57, n. 7, p.592-595, jul. 1994. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-57.7.592>.

CÉLIA ROMÃO (Rio de Janeiro). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (Org.). **Avaliação da atividade bactericida de desinfetantes**. Disponível em: <https://www.incqs.fiocruz.br/index.php?option=com_content&view=featured&Itemid=166>. Acesso em: 25 out. 2018.

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

CHAN, Maurice Kok Leong; KOO, Seok Hwee; QUEK, Qingyao; PANG, Wan Sia; JIANG, Boran; YONG NG, Lily Siew; TAN, Si Huei; YEN, Thean. Development of a real-time assay to determine the frequency of qac genes in methicillin resistant Staphylococcus aureus. **Journal Of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 153, p.133-138, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.017>.

FRANZIN, Mauricio. **Biguanida Polimérica Versatilidade e Diversificação em um só Produto**. 2009. Disponível em: <http://www.opportuna.com.br/produtos/arquivos/Biguanida_Arch.pdf>. Acesso em: 06 out. 2018.

GAVA, Altanir Jaime; SILVA, Carlos Alberto Bento da; FRIAS, Jenifer Ribeiro Gava. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e aplicações**. São Paulo: Nobel, 2008. 511 p.

KEERTHIRATHNE, Thilini; ROSS, Kirstin; FALLOWFIELD, Howard; WHILEY, Harriet. A Review of Temperature, pH, and Other Factors that Influence the Survival of Salmonella in Mayonnaise and Other Raw Egg Products. **Pathogens**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.63-89, 18 nov. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/pathogens5040063>.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A.. Different Responses of Planktonic and Attached Bacillus subtilis and Pseudomonas fluorescens to Sanitizer Treatment. **Journal Of Food**

Protection, [s.l.], v. 62, n. 4, p.368-379, abr. 1999. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x-62.4.368>.

MA, Luyan; CONOVER, Matthew; LU, Haiping; PARSEK, Matthew R.; BAYLES, Kenneth; WOZNIAK, Daniel J. Assembly and Development of the *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Matrix. **Plos Pathogens**, [s.l.], v. 5, n. 3, p.100-354, 27 mar. 2009. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000354>.

MAZZOLA, Priscila G; MARTINS, Alzira Ms; PENNA, Thereza Cv. Chemical resistance of the gram-negative bacteria to different sanitizers in a water purification system. **Bmc Infectious Diseases**, [s.l.], v. 6, n. 1, p.1-13, 16 ago. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-6-131>.

PENG, Jui-sen; TSAI, Wei-chong; CHOU, Cheng-chun. Inactivation and removal of *Bacillus cereus* by sanitizer and detergent. **International Journal Of Food Microbiology**, [s.l.], v. 77, n. 1-2, p.11-18, jul. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00060-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00060-0).

RABINOVITCH, Leon; OLIVEIRA, Edmar Justo de. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos**. Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015. 160 p.

SILVA JUNIOR, Eneo Alves da. **Manual de Controle Higiênico-Sanitário em Serviços de Alimentação**. 6. ed. São Paulo: Varela, 1995. 625 p.

WANG, Rong; JAMES L. Bono, KALCHAYANAND, Norasak; SHACKELFORD, Steven; HARHAY, Dayana M. Biofilm Formation by Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* O157: H7 and Non-O157 Strains and Their Tolerance to Sanitizers Commonly Used in the Food Processing Environment. **Journal Of Food Protection**, [s.l.], v. 75, n. 8, p.1418-1428, ago. 2012. International Association for Food Protection. <http://dx.doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-11-427>.

WILKS, C. Jessica; KITKO, D. Ryan ; CLEETON, H. Sarah; LEE, E. Grace; UGWU, S. Chinagozi; JONES, D.Brian; BONDURANT, S. Sandra; SLONCZEWSKI, L. Joan. Acid and Base Stress and Transcriptomic Responses in *Bacillus subtilis*. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 75, n. 4, p.981-990, 29 dez. 2008. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.01652-08>.

ZIECH, Rosangela Estel; PERIN, Ana Paula; LAMPUGNANI, Camila; SERENO, Mallu Jagnow; VIANA, Cibeli; SOARES, Vanessa Mendonça; PEREIRA, Juliano Gonçalves; PINTO, José Paes de Almeida Nogueira; BERSOT, Luciano dos Santos. Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. isolated from Brazilian poultry processing plants. **Lwt - Food Science And Technology**, [s.l.], v. 68, p.85-90, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.021>.