

CLEUSA KIYOMI AKUTSU

**ADESÃO DE ESPOROS DE *Bacillus sporothermodurans* AO AÇO
INOXIDÁVEL E SUA RESISTÊNCIA A SANIFICANTES QUÍMICOS EM
CONDIÇÕES DE USO SIMULADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA
MINAS GERAIS –BRASIL
2001

CLEUSA KIYOMI AKUTSU

**ADESÃO DE ESPOROS DE *Bacillus sporothermodurans* AO AÇO
INOXIDÁVEL E SUA RESISTÊNCIA A SANIFICANTES QUÍMICOS EM
CONDIÇÕES DE USO SIMULADO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 21 de maio de 2001.

Prof.^a Edna Fröeder Arcuri
(Conselheiro)

Prof. Frederico José Vieira Passos

Prof. Afonso Mota Ramos

Prof. Marco Antônio Moreira Furtado

Prof. Nélio José de Andrade
(Orientador)

A Deus, por esta oportunidade.

Aos meus pais Seiti e Hatumi, pelo amor, pela paciência, pelas palavras de consolo e pelos braços estendidos em minha direção em todos os momentos da minha vida.

À minha irmã Heloísa, pelo apoio, pela amizade e pelo incentivo sempre presente.

Aos meus avós Hiroo e Kiyoko (*in memoriam*), pelo incentivo e apoio.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Nélio José de Andrade, pela orientação, pela confiança, pela amizade, pelos ensinamentos e pelo apoio, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À professora Edna Fröder Arcuri, pelo auxílio e pelos oportunos esclarecimentos.

Ao professor José Benício Paes Chaves, pela colaboração e pelas sugestões.

Aos professores Frederico J. V. Passos, Afonso M. Ramos e Marco Antônio M. Furtado, pelas valiosas sugestões e correções.

A todos os amigos e amigas, em especial a Aurélia, Patrícia, Cleuber, Silvia Ribeiro, Barancio, Kelly, Elisângela, Marciana, Wellingta, José Manoel, Lucía de los Angeles, Luciana, Nástia e Paulo, pelo apoio, incentivo, pela troca de conhecimento e pelos bons momentos compartilhados.

Às minhas companheiras de “república” Joseane, Ana Paula, Cláudia e Luciana, pela amizade, pelo apoio e companheirismo.

Aos amigos e amigas que estavam distantes e ao mesmo tempo presentes, Eraldo, Gláucio, Cynthia, Sandra e Tânia.

À galera do 204/1999, pelo incentivo e apoio.

A todos os funcionários do DTA e, em especial, a Geralda, Maria Rita, Luiz, Carlinhos, Manoel, Antônio Tito, Cláudio e Perereca.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

CLEUSA KIYOMI AKUTSU, filha de Seiti Akutsu e Hatumi Akutsu, nasceu em Atibaia, Estado de São Paulo, em 4 de fevereiro de 1976.

Em março de 1999, graduou-se em Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa.

Em abril de 1999, iniciou o curso de Pós-graduação em nível de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, na Universidade Federal de Viçosa.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. <i>Bacillus sporothermodurans</i> e suas implicações na indústria de laticínios.....	3
2.2. Adesão microbiana e formação de biofilmes.....	5
2.3. Aço inoxidável como superfície de contato.....	8
2.4. Higienização nas indústrias de alimentos.....	8
2.4.1. Técnica de ATP bioluminescência.....	11
2.4.2. Sanificantes químicos.....	14
2.4.2.1. Compostos clorados.....	14

2.4.2.2. Ácido peracético.....	18
2.4.3. Técnicas para a avaliação da eficiência microbiológica de sanificantes.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1. Soluções sanificantes.....	23
3.2. Suspensão de esporos.....	25
3.3. Descrição do modelo de linha de circulação de leite.....	26
3.4. Adesão da suspensão de esporos de <i>Bacillus sporothermodurans</i> CCT6247.....	27
3.4.1. Preparo dos cupons de prova.....	27
3.4.2. Adesão dos esporos.....	28
3.5. Avaliação da eficiência dos sanificantes químicos.....	29
3.6. Avaliação da higienização dos cupons de prova pela técnica de ATP bioluminescência.....	30
3.7. Delineamento experimental.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. Adesão de esporos de <i>Bacillus sporothermodurans</i> em aço inoxidável.....	34
4.2. Ação dos agentes químicos sanificantes sobre os esporos de <i>Bacillus sporothermodurans</i>	37
4.3. Avaliação do processo de higienização dos cupons de prova.....	49
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
APÊNDICE.....	61

LISTA DE QUADROS

	Página
1. Concentração e pH das soluções sanificantes preparadas a partir de produto comercial concentrado.....	24
2. Comparações de interesse entre sanificantes por cupom de prova.....	33
3. Porcentagem e \log_{10} do número de esporos de <i>B. sporothermodurans</i> (UFC/cm ²) aderidos em aço inoxidável, AISI 304, após 12 horas de contato a 30°C. Média de 24 observações.....	35
4. Resumo da análise de variância do \log_{10} do número de esporos/cm ² de <i>B. sporothermodurans</i> aderidos nos diferentes cupons de prova do modelo de linha de circulação de leite, após 12 horas de incubação a 30°C.....	35
5. Resumo da análise de variância do número de reduções decimais de <i>B. sporothermodurans</i> pela ação dos sanificantes, nos diferentes cupons de prova do modelo de linha de circulação de leite, após circulação a 1,5 m/s por 15 minutos, à temperatura ambiente (20-25°C).	38
6. Resumo do teste F para as comparações de interesse entre sanificantes.....	38

7. Reduções decimais (RD) na população de esporos de <i>B. sporothermodurans</i> devido à ação dos sanificantes circulados por 15 minutos a 1,5 m/s, à temperatura ambiente (20-25° C), no modelo de linha de circulação de leite. Média de três repetições.....	40
8. Efeito da concentração de ácido hipocloroso (HClO) das soluções sanificantes na ação esporicida sobre <i>B. sporothermodurans</i>	42
9. Valores de D para esporos de <i>B. sporothermodurans</i> em função de sanificantes circulados a 1,5 m/s por 15 minutos, à temperatura ambiente (20-25° C), no modelo de linha de circulação de leite.....	46
10. Custo de aquisição de sanificantes disponíveis no mercado, em dólar.....	48
11. Avaliação dos cupons de prova pela técnica de ATP bioluminescência após a higienização CIP e esterilização a 121° C por 15 minutos. Valores expressos em Unidade Relativa de Luz (URL).....	49
12. Avaliação dos cupons de prova pela técnica de ATP bioluminescência após a adesão de esporos de <i>B. sporothermodurans</i> , ao final de 12 horas de incubação a 30° C, com a suspensão contendo cerca de 10 ⁵ esporos/cm ² . Valores expressos em URL.....	49
13. Avaliação dos cupons de prova pela técnica de ATP bioluminescência após a sanificação CIP, utilizando solução a 60 mg/L de ácido peracético por 15 minutos à temperatura ambiente (20-25° C), a uma velocidade de 1,5 m/s, e um pré-enxágüe por três minutos com água. à temperatura ambiente . (20-25° C).Valores expressos em URL.....	47
1A. Médias das duplicatas do número inicial de esporos de <i>B. sporothermodurans</i> aderidos e número de sobreviventes (n° final) após a sanificação, com respectivo número de reduções decimais (RD), no cupom de prova na forma de cotovelo 90°	62

2A. Médias das duplicatas do número inicial de esporos de <i>B. sporothermodurans</i> aderidos e números de sobreviventes (nº final) após a sanificação, com respectivo número de reduções decimais (RD), no cupom de prova cilíndrico.....	63
3A. Médias das duplicatas do número inicial de esporos de <i>B. sporothermodurans</i> aderidos e números de sobreviventes (nº final) após a sanificação, com respectivo número de reduções decimais (RD), no cupom de prova T.....	64
4A. Porcentagem de adesão inicial de esporos de <i>B. sporothermodurans</i> e final após a sanificação no cupom de prova na forma de cotovelo 90° .	65
5A. Porcentagem de adesão inicial de esporos de <i>B. sporothermodurans</i> e final após a sanificação, no cupom de prova cilíndrico.....	66
6A. Porcentagem de adesão inicial de esporos de <i>B. sporothermodurans</i> e final após a sanificação, no cupom de prova T.....	67
7A. Resumo da análise de variância do valor de D em função da concentração de HClO.....	68

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Modelo de linha de circulação de leite (1-cupom de prova cotovelo 90°; 2-cupom de prova cilíndrico; 3-cupom de prova T; 4-Controle de potência; 5- Tanque cilíndrico; 6-Bomba centrífuga; 7-Controle de vazão).....	27
2. Valor de D em função da concentração de ácido hipocloroso.....	44

RESUMO

AKUTSU, Cleusa Kiyomi, M.S., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2001.
Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* ao aço inoxidável e sua resistência a sanificantes químicos em condições de uso simulado. Orientador: Nélio José de Andrade. Conselheiros: Edna Fröeder Arcuri e José Benício Paes Chaves.

Esporos de *Bacillus sporothermodurans* CCT6247 foram avaliados quanto à adesão em cupons de aço inoxidável e resistência a sanificantes químicos, em condições de uso simulado, utilizando um modelo de linha de circulação de leite, em aço inoxidável AISI 304. Seis cupons de prova, sendo dois em formato de cotovelo 90°, dois cilíndricos e dois em T, foram inoculados com uma suspensão, em tampão fosfato, de 0,31 M em pH $7,0 \pm 0,1$, contendo cerca de 10^5 esporos/mL por 12 horas a 30°C. A quantificação dos esporos foi feita em três dos seis cupons após rinsagem com tampão fosfato, durante 15 minutos, plaqueando diluições adequadas por espalhamento superficial em ágar BHI e incubação a 37°C/24h. Depois, os seis cupons foram conectados, em pontos específicos, no modelo utilizado. Simulou-se um processo de sanificação, circulando-se 15 L dos sanificantes por 15 minutos a uma velocidade de 1,5 m/s, à temperatura ambiente (20-25°C), pelas tubulações. Verificou-se que não houve diferença ($P \geq 0,05$) na adesão entre os cupons cotovelo 90°, cilíndrico e T. O \log_{10} do número de esporos aderidos por cm^2 nesses cupons foi,

respectivamente, de 4,01, 3,88 e 4,03, correspondentes a 3,93, 2,55 e 4,46% de adesão. Nenhum dos sanificantes obteve três reduções decimais (RD) na população de esporos, valor sugerido na aprovação de sanificantes, atuando sobre microrganismos aderidos. Não houve diferença ($P \geq 0,05$) entre os sanificantes, com exceção do hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, em pH 9,45, que apresentou a menor eficiência (1,57 RD), e também não se observou influência do tipo de cupom na ação dos sanificantes. Os números de reduções decimais obtidos, em ordem decrescente, foram 2,84; 2,77; 2,67; 2,47; 2,43; e 2,26 RD para as soluções de hipoclorito contendo 100 mg/L em pH 7,0; de cloramina orgânica contendo 100 mg/L em pH 7,18; de hipoclorito contendo 100 mg/L em pH 8,0; de cloramina orgânica contendo 60 mg/L, em pH 7,18; de ácido peracético a 60 mg/L em pH 3,4; e de ácido peracético a 30 mg/L em pH 3,7, respectivamente. Portanto, os resultados sugerem que o uso de hipoclorito corrigido para pH 8,0 ou 7,0 pode ser escolhido sem prejuízo da eficiência do processo de higienização, além de apresentar menor custo. Avaliando a higienização dos cupons pela técnica de ATP bioluminescência, verificou-se inconsistência entre os resultados desta técnica e do método tradicional de contagem em placa na detecção de esporos aderidos ao aço inoxidável, em razão, provavelmente, do baixo nível de ATP detectável desses esporos.

ABSTRACT

AKUTSU, Cleusa Kiyomi, M.S, Universidade Federal de Viçosa, May 2001.
Adherence of *Bacillus sporothermodurans* on stainless steel and their resistance to chemical sanitizers in simulated use conditions.. Adviser: Nélio José de Andrade. Committee members: Edna Fröeder Arcuri and José Benício Paes Chaves.

Bacillus sporothermodurans CCT 6247 spores were evaluated for attachment on stainless steel coupons and resistance to chemical sanitizing agents, under simulated conditions, using a milk circulation AISI 304 stainless steel pipe system. Six coupon tests (two 90° elbow, two cylindrical and two T-piece) were inoculated in a phosphate buffer, 0.31M, pH 7.0 ± 0.1 suspension, containing around 10⁵ spores/ mL during 12 h at 30°C. Spore quantification was performed in 3 of 6 coupons following phosphate buffer rinsing for 15 min., plating adequate dilutions on BHI agar plate and incubation at 37°C/24h. The six coupons were then connected at specific points in the model. A sanitizing process was simulated by circulating 15 L of the sanitizing agents for 15 min. at a speed of 1.5 m/s at room temperature (20-25°C) through the tubes. No difference ($P \geq 0.05$) was verified in the attachment among the 90° elbow, the cylindrical and the T-piece coupons. The spore number \log_{10} attached per cm² on these coupons were, respectively, 4.01, 3.88 and 4.03, which correspond to 3.93, 2.55 and 4.46%. None of the sanitizing agents obtained 3 decimal reductions (DR) within the spore population, a value suggested for the sanitizing agents approval, when acting on the attached microorganisms. No difference

was found ($P \geq 0.05$) among the sanitizing agents, except for sodium hypochlorite at 100 mg/L of CRT, pH 9.45, which showed the least efficiency (1.57 DR) nor any influence of the type of coupon was observed on the sanitizing agents' action. The decimal reductions number reached, in decreasing order, 2.84, 2.77, 2.67, 2.47, 2.43 and 2.26 DR for the hypochlorite solution containing 100 mg/L, pH 7.0; the organic chloramine solutions containing 100 mg/L, pH 7.18; hypochlorite containing 100 mg/L, pH 8.0; organic chloramine containing 60 mg/L, pH 7.18; peracetic acid at 60 mg/L in pH 3.4; and of peracetic acid at 30 mg/L in pH 3.7, respectively. Thus, the results suggest that the use of hypochlorite corrected for 8.0 or 7.0 can be chosen without compromising the process of higienization, besides presenting lower cost. When evaluating the coupons higienization by bioluminescence ATP technique, inconsistency between the results of this technique and those of the traditional method of plate counting was observed in detecting spores attached to the stainless steel, this being probably due to these spores low detectable ATP levels.

1. INTRODUÇÃO

As indústrias de laticínios do Brasil e do exterior vêm enfrentando problemas com a presença de *Bacillus sporothermodurans* em leite longa vida e outros produtos. Embora não haja indícios, pelas pesquisas efetuadas até o momento, de que este microrganismo seja patogênico, sua presença em leite UAT é indesejável, pois pode contribuir para o aumento no número de mesófilos aeróbios e ultrapassar o padrão recomendado pela Portaria nº 370/97 do Ministério da Agricultura, que estabelece o valor máximo de $1,0 \times 10^2$ UFC/mL para este produto (BRASIL, 1997).

As fontes e os processos de contaminação não estão totalmente esclarecidos, mas acredita-se que o leite cru seja contaminado na fazenda por esporos presentes na ração animal, durante o transporte ou na área de pré-processamento. Alguns estudos em fábricas da Europa que apresentaram produtos contaminados constataram a presença deste microrganismo em todos os equipamentos UAT, sugerindo que ele seja capaz de aderir em superfícies.

Uma superfície mal higienizada, somada à capacidade de adesão de um microrganismo, pode se tornar uma fonte potencial de contaminação e levar à formação de biofilmes. Estes, uma vez formados, são de difícil remoção, sendo importante evitá-los nos processos iniciais, antes que os microrganismos sintetizem substâncias exopolissacarídicas. A realização de um processo de higienização adequado, ou seja, que siga corretamente as normas de limpeza e sanificação determinadas, como controle da concentração das soluções, tempo e temperatura de aplicação, fluxo da solução, é suficiente para evitar a formação de biofilmes.

Pelo fato de esporo bacteriano possuir maior capacidade de adesão que células vegetativas, devido à sua alta hidrofobicidade e morfologia, a escolha de sanificantes eficientes contra esporos é necessária para manter a qualidade do leite processado.

Entre os sanificantes químicos com capacidade esporicida mais utilizados incluem-se os compostos clorados inorgânicos e orgânicos, o ácido peracético e o peróxido de hidrogênio.

A seleção de sanificantes pode ser efetuada com base em testes laboratoriais, como os testes de diluição de uso e de suspensão; em testes em uso, que incluem os testes do swab, da rinsagem e da placa de contato; e em testes de uso simulado, que consistem em simular as condições da indústria no laboratório, oferecendo informações mais próximas da realidade.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar a adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* em aço inoxidável, a resistência destes esporos aderidos em cupons de prova de um modelo de linha de circulação de leite à ação de sanificantes químicos e fornecer subsídios à indústria de laticínios para o controle deste microrganismo. Além disso, o procedimento de higienização dos cupons de prova foi avaliado pela técnica de ATP bioluminescência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Bacillus sporothermodurans* e suas implicações na indústria de laticínios

Bacillus sporothermodurans é uma espécie mesofílica estritamente aeróbia, descrita recentemente (PETTERSSON et al., 1996). Esta espécie é caracterizada pela produção de esporos altamente resistentes ao calor (cepas EARC), que geralmente sobrevivem ao tratamento térmico UAT (Ultra Alta Temperatura) do leite, podendo subseqüentemente germinar e se reproduzir durante a estocagem (HERMAN et al., 1998).

Este microrganismo foi isolado pela primeira vez em 1985 em leite UAT na Itália e Áustria (HAMMER et al., 1995). No Brasil, a partir de maio de 1997 passou a ser constatada a sua presença no leite UAT pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF)/MARA (Ministério da Agricultura e Reforma Agrária) (ZACARCHENCO e LEITÃO, 1999). Foi detectado também em leite evaporado e leite reconstituído (KLIJN et al., 1997), mas não há registros de problemas na distribuição e no consumo desses produtos em relação ao *B. sporothermodurans*. No entanto, já se verificou desenvolvimento de coloração rósea e coagulação induzida pelo calor em produtos contaminados com este microrganismo e envasados em garrafas de plástico (HAMMER et al., 1995).

Pesquisa recente realizada por ZACARCHENCO et al. (2000) evidenciou, em laboratório, que a maioria das cepas isoladas de amostras contaminadas de leite UAT, produzido nas regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste do Brasil, apresentou características morfológicas e bioquímicas típicas de *Bacillus sporothermodurans*, conforme relatado por PETTERSSON et al. (1996). No entanto, houve exceção nos testes de fermentação

de glicose, em que a maior parte das cepas isoladas evidenciou fermentação tardia da glicose (7 dias).

As cepas estudadas por PETTERSSON et al. (1996) eram compostas por bactérias estritamente aeróbias, apresentando reação negativa de Voges-Proskauer e positiva nas provas de catalase e oxidase, além de não produzirem ácido a partir de açúcares (celobiose, frutose, galactose, glicose, lactose, manitol, rafinose, salicina e xilose). Estas cepas hidrolisaram a esculina, e a maioria não hidrolisou arbutina, arginina, gelatina, uréia (com exceção de uma cepa) e apresentou fraca hidrólise de caseína. Elas também não reduziram nitrato a nitrito e não utilizaram citrato como fonte de carbono. A temperatura ótima era em torno de 37°C, mas houve crescimento na faixa de 20 a 45°C e algumas cepas cresceram a 50°C, incluindo a cepa típica M215 isolada de leite UAT e depositada na coleção de culturas “Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen”, como cepa DSMZ 10599. Demonstraram melhor crescimento em ágar BHI, quando comparado com ágar nutriente. Quanto à morfologia, as cepas obtidas em laboratório apresentaram-se sob a forma de bastonetes alongados e filamentosos, com mais de 30 µm de comprimento e 0,7 µm de diâmetro, produzindo coloração indefinida, às vezes gram-positiva, outras vezes gram-negativa. No entanto, também foram observados alguns bastonetes com 3,4 µm a 8,2 µm de comprimento, principalmente logo após isolamento primário do leite. Havia motilidade das células por meio de flagelos peritríqueos, e os esporos apresentaram forma elipsoidal com cerca de 1,7 µm, localizados em posição terminal, não-intumescidos. As colônias eram pequenas, lisas e de coloração branca ou bege, não havendo pigmento solúvel.

ZACARCHENCO e LEITÃO (1999) obtiveram melhor crescimento de *B. sporothermodurans* em ágar BHI usando a técnica de espalhamento superficial. Estes autores desenvolveram um meio de diferenciação para este microrganismo, constituído de ágar BHI acrescido de 0,5 g/L de citrato férrico amoniacal e 1 g/L de esculina, obtendo formação de colônias marrons ou negras, com halo de cor semelhante ao redor, devido à hidrólise de esculina na presença de citrato férrico amoniacal. Verificaram que este microrganismo não era o único a hidrolisar a esculina; entretanto, formava halo negro de maior diâmetro ao redor da colônia, além de

apresentar colônias menores, lisas e mais uniformes em relação às espécies *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis* estudadas.

As poucas referências bibliográficas sobre *B. sporothermodurans* não evidenciam que este microrganismo seja patogênico. No entanto, quando presente no leite UAT devido à alta resistência ao calor de seus esporos, pode contribuir para o aumento do número de mesófilos aeróbios e ultrapassar o padrão recomendado pela Portaria nº 370/97 do Ministério da Agricultura, que estabelece o valor máximo de $1,0 \times 10^2$ UFC/mL para este produto (BRASIL, 1997).

Não estão completamente elucidados as fontes e o processo de contaminação de *B. sporothermodurans*. Parece provável que os esporos contaminam o leite cru ainda na fazenda, originários talvez de ração animal. Também, há a possibilidade de que a contaminação ocorra durante o transporte ou na área de pré-processamento do leite (PETTERSSON et al., 1996). Estudos realizados em fábricas da Europa que apresentavam produtos contaminados com *B. sporothermodurans* detectaram a presença destes microrganismos em quase todos os tipos de equipamentos para processamento do leite UAT (HAMMER et al., 1995), o que sugere a possibilidade de eles aderirem à superfície de equipamentos, tornando-se possível foco de contaminação dos alimentos.

2.2. Adesão microbiana e formação de biofilmes

A adesão microbiana e a formação de biofilmes ocorrem devido à deposição de microrganismos em uma superfície de contato, onde eles se fixam e iniciam o crescimento (ZOTTOLA 1994, 1997; ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

Um grande número de microrganismos alteradores e patogênicos é capaz de participar com maior ou menor intensidade desses processos de adesão. Dentre os alteradores estão *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fragi*, *Micrococcus sp.*, e, em relação aos patogênicos, incluem-se *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli* O157: H7 e *B. cereus* (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

Diversos fatores influenciam a adesão microbiana às superfícies, dentre os quais incluem-se as características do microrganismo, como espécie, carga, hidro fobicidade, concentração, presença de apêndices superficiais, como pili, fimbrias, flagelo, cápsula; a síntese de substâncias exopoliméricas; as características do material aderente, como carga e

microtopografia; e as características do meio que envolve o microrganismo, tais como pH, temperatura, tempo de contato, agitação (TROLLER, 1993; ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; BOWER et al., 1996).

As primeiras interações que as células têm com o substrato são aquelas forças de curta distância, envolvendo carga e hidrofobicidade (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994; ZOTTOLA, 1997). A hidrofobicidade tem sido atribuída à membrana externa da célula bacteriana (ZOTTOLA, 1997).

A carga do substrato tem papel importante na adesão. Em superfícies altamente carregadas, como o vidro, verifica-se adesão máxima e menos em superfícies pouco carregadas, como poliestireno. No entanto, a microtopografia pode mudar a densidade de carga eletrostática, afetando a adesão, assim como os diferentes tipos de moléculas orgânicas, condicionando o substrato (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

Células que se fixam ao substrato e permanecem associadas a ele eventualmente produzem substâncias exopoliméricas (TROLLER, 1993; ZOTTOLA, 1994; ZOTTOLA, 1997; ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

Os biofilmes são constituídos de bactérias aderidas às superfícies, que por sua vez são envolvidas por uma camada de partículas de matéria orgânica, ou seja, são depósitos onde microrganismos estão fortemente aderidos a uma superfície por meio de filamentos de natureza polissacarídica, denominados glicocálix (CRIADO et al., 1994). Os biofilmes contêm partículas de proteínas, lipídeos, fosfolipídeos, carboidratos, sais minerais e vitaminas, entre outros, que formam um depósito onde os microrganismos continuam a crescer, formando um cultivo puro ou uma associação com outros microrganismos (MOSTELER e BISHOP, 1993).

Várias propostas de formação de biofilmes têm sido sugeridas ocorrer em processos de duas, três e cinco etapas (ZOTTOLA, 1994). Na proposta de duas etapas, o primeiro passo é reversível e envolve a associação de células próximas ao substrato sem haver o contato. Depois, a célula eventualmente sintetiza substâncias exopoliméricas que aparecem na sua superfície, ligando-a diretamente ao substrato. A ponte formada entre a célula e o substrato funciona como cola, que liga a célula de maneira irreversível à superfície. Já no modelo de três etapas, sugere-se que o contato direto da célula com o substrato não ocorre devido às forças de Van der Waals e forças eletrostáticas exibidas a distâncias maiores que 50

nm e de 10 a 20 nm do substrato, respectivamente. Por causa do espaço vazio, assume-se que forças mais fortes superariam a força eletrostática e removeriam as células. Parâmetros físicos como taxa de fluxo do fluido, carga, hidrofobicidade e microtopografia do substrato afetam o grau de associação da célula ao substrato. Para a célula se ligar à superfície, ela precisa vencer uma barreira de interação, descrita pela teoria DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeck) como uma barreira de repulsão de alta energia, que é afetada pela área de superfície de uma partícula ou célula. Então, uma bactéria com protuberâncias na superfície, como pili, poderia superar esta barreira e ajudar a célula a chegar a uma região estável, onde começará crescimento de microcolônia e biofilme. A outra teoria, constituída de cinco passos, propõe o transporte de nutrientes e matérias orgânica e inorgânica para a superfície sólida, com conseqüente formação de uma camada. Haveria então a adesão de células microbianas à superfície e o início do crescimento celular. Na etapa seguinte, ocorre intensa atividade metabólica no biofilme e, finalmente, células seriam liberadas do biofilme.

A formação de biofilme pode ser desejável ou indesejável. Por exemplo, é desejável em biorreatores, para produção de fermentados. Bactérias produtoras de ácido acético crescem, se agregam em fragmentos de madeira e convertem diversos substratos em vinagre. Esses agregados microbianos são também usados em tratamentos aeróbios e anaeróbios de águas residuárias, na remoção de matérias orgânica e inorgânica. Por outro lado, biofilmes microbianos tornam menos eficiente o processo de cloração de água (BEER et al., 1994) e podem se tornar fonte potencial de contaminação microbiana nas indústrias de alimentos (ZOTTOLA, 1994; ASSANTA et al., 1998). No que se refere aos aspectos microbiológicos, a adesão pode constituir-se de microrganismos alteradores e/ou patogênicos, que resultam em sérios problemas de higiene, de saúde pública ou de ordem econômica (CRIADO et al., 1994).

Esporos geralmente fixam-se às superfícies a uma taxa maior que as células vegetativas, porque o processo é facilitado pela sua alta hidrofobicidade e morfologia (BOWER et al., 1996). É bem evidenciado na literatura que microrganismos aderidos e os esporos apresentam resistência maior à

ação de sanificantes. A fim de prevenir a formação de biofilmes, nenhuma etapa do processo de higienização pode ser negligenciada.

2.3. Aço inoxidável como superfície de contato

Pesquisas realizadas constataam que diversas superfícies encontradas nas indústrias de alimentos, como aço inoxidável, vidro, borracha, fórmica, polipropileno e o ferro forjado, são passíveis de apresentar a formação de biofilmes, além de superfícies de alimentos, como frutas, vegetais, carcaças de animais e peixes (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

O aço inoxidável é o principal material de contato usado pelas indústrias de alimentos, porque é estável em uma variedade de temperaturas de processamento, além de ser fácil de higienizar e ter alta resistência à corrosão. A microtopografia do aço inoxidável é composta de ranhuras e fendas, que permitem a proteção das bactérias contra as forças exercidas pelo fluxo do fluido (ZOTTOLA e SASAHARA, 1994).

2.4. Higienização nas indústrias de alimentos

A higienização visa garantir a qualidade final dos produtos e preservar a saúde do consumidor. É fundamental no controle e na prevenção de biofilmes.

As falhas nos procedimentos de higienização podem originar contaminações por microrganismos patogênicos e/ou alteradores, substâncias químicas, agentes físicos, além da contaminação cruzada (Silva et al., citados por ROCHA et al., 1999).

Nas indústrias de alimentos, o processo de higienização compreende as etapas de limpeza e sanificação, que são complementares (ANDRADE e MACÊDO, 1996; ROCHA et al., 1999).

A limpeza inclui as etapas de pré-lavagem com água, para remoção das sujidades, seguida do uso de agentes químicos, detergentes alcalinos e/ou ácidos, para remoção de resíduos orgânicos e minerais das superfícies, e do enxágüe antes da sanificação (ANDRADE e MACÊDO, 1996; GIESE, 1991). Quando é realizada corretamente, diminui-se a possibilidade das

sujidades de proteger os microrganismos da ação dos sanificantes, além de se obter redução da carga microbiana (ANDRADE e MACÊDO, 1996; GÂNDARA e OLIVEIRA, 2000; KRYSINSKI et al., 1992; MARRIOTT, 1995).

A sanificação visa eliminar microrganismos patogênicos e reduzir alteradores das superfícies de equipamentos, utensílios, manipuladores e dos ambientes até níveis considerados seguros, podendo ser realizada tanto por sanificantes físicos, como o calor, na forma de vapor, água ou ar quente, e a radiação, particularmente a radiação ultravioleta, quanto por sanificantes químicos, como os compostos clorados, iodóforos, composto quaternário de amônia, ácido peracético, entre outros (ANDRADE e MACÊDO, 1996; ROCHA et al., 1999).

Quando há presença de resíduos de matéria orgânica em superfícies, além de proteger os microrganismos da ação do sanificante e servir como fonte de nutrientes, eles podem reagir com o sanificante, reduzindo sua eficiência, como no caso dos compostos clorados (ANDRADE e MACÊDO, 1996; GIESE, 1991; MARRIOTT, 1995; TROLLER, 1993). Portanto, a formação de biofilmes reduzirá a eficiência dos sanificantes.

Tempo de exposição, pH, concentração, temperatura, dureza da água, limpeza da superfície (GIESE, 1991; MARRIOTT, 1995; ANDRADE e MACÊDO, 1996) e adesão bacteriana (ANDRADE e MACÊDO, 1996; MARRIOTT, 1995) são os fatores mais importantes que afetam a atividade antimicrobiana do sanificante.

O sucesso no programa de higienização das indústrias de alimentos depende da escolha correta dos agentes de limpeza e sanificação, que é baseada no tipo e grau dos resíduos aderidos às superfícies, na qualidade da água empregada, na natureza da superfície a ser higienizada, nos tipos e níveis de contaminação microbiológica e nos métodos de higienização aplicados (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

Dentre os métodos de higienização encontra-se o sistema CIP (Cleaning In Place), que está presente praticamente em todas as indústrias de laticínios (TIMPERLEY, 1981; SHARP, 1985; GIESE, 1991). Trata-se de um sistema automático e permanente, que não requer a desmontagem de equipamentos e tubulações para a higienização (ANDRADE e MACÊDO, 1996). É constituído basicamente por uma bomba central, tanque para

soluções químicas e um sistema de tubos para distribuição das soluções para os diversos locais da fábrica, podendo ainda estar acoplado a um tanque para água de rinsagem e a um computador, que controlará o processo de higienização (TROLLER, 1993).

Esse processo possibilita controle eficiente do fluxo, temperatura, tempo de contato das soluções circuladas, permitindo menor tempo de higienização e diminuição do gasto de água, tornando o processo mais econômico (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

Em limpeza de tubulações, a taxa de escoamento do fluido (ação mecânica) é importante para se obter um processo de higienização eficiente, além dos outros fatores, como ação química e térmica e tempo de contato (ANDRADE e MACÊDO, 1996). Para uma higienização adequada, a Federação Internacional de Laticínios determinou como velocidade mínima 1,5 m/s para os agentes de limpeza e sanificantes (FLOH, 1993).

Em qualquer sistema de escoamento de fluido, forma-se uma película de separação, ou camada-limite, entre o fluido e a superfície, ou seja, o fluido é difundido pela superfície numa fina camada (FOUST et al., 1982). Há dois tipos de escoamento: o laminar e o turbulento (FELLOWS, 1994). O escoamento laminar caracteriza-se pelo movimento das partículas do fluido em camadas ou lâminas, segundo trajetórias retas e paralelas. No escoamento turbulento o movimento dessas partículas ocorre de forma desordenada. O escoamento do fluido é caracterizado por um grupo adimensional, denominado número de Reynolds, que, sendo superior a 4.000, indica fluxo turbulento, é calculado segundo a equação 1 a seguir (FELLOWS, 1994; FOUST et al., 1982):

$$Re = \frac{\rho v D}{\mu} \quad (1)$$

em que

ρ = massa específica do fluido (kg/m^3);

v = velocidade do escoamento (m/s);

D = diâmetro da tubulação (m); e

μ = viscosidade do fluido (kg/m.s).

A turbulência principia num núcleo central, que cresce nas dimensões radiais com o aumento da velocidade média. Torna-se mais intensa com o aumento da velocidade, aumentando a tensão na parede do tubo e diminuindo a camada-limite, e isso resulta em aumento na taxa de transferência do fluido até a superfície (FOUST et al., 1982).

Partículas aderidas à tubulação podem ser removidas pela força de atrito exercida pelo contato entre a camada do fluido e a superfície, sendo a magnitude desta força dependente do tipo de escoamento (MCCABE et al., 1993), onde um fluxo turbulento exercerá maior força de atrito que um escoamento laminar.

A velocidade do fluido em tubo cilíndrico está relacionada com a vazão, conforme a equação 2:

$$V = \frac{v\pi d^2}{4} \quad (2)$$

em que

V = vazão do escoamento (m³/s);

d = diâmetro da tubulação (m); e

v = velocidade (m/s).

2.4.1. Técnica de ATP bioluminescência

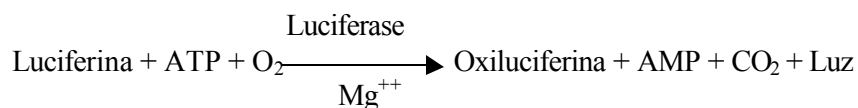
A avaliação do procedimento da higienização de equipamentos e utensílios, que entram em contato direto com os alimentos, é uma preocupação constante das indústrias de alimentos, que necessitam de resultados rápidos para garantir a qualidade dos produtos processados e a segurança aos consumidores.

Os métodos tradicionais de análise microbiológica, como contagem-padrão em placa, são trabalhosos e demorados, necessitando de tempo de incubação de 24 a 72 horas (KENNEDY e OBLINGER, 1985). Além disso, não detectam a presença de resíduos que permanecem nas superfícies após a higienização, tornando-se uma possível fonte de contaminação de

alimentos e podendo, também, diminuir a eficiência de sanificantes (HAWRONSKYJ e HOLAH, 1997; VELAZQUEZ e FEIRTAG, 1997).

Métodos rápidos, sensíveis e precisos têm sido desenvolvidos para a enumeração de microrganismos e detecção de resíduos orgânicos, a fim de atender às necessidades das indústrias de alimentos (KENNEDY e OBLINGER, 1985; HAWRONSKYJ e HOLAH, 1997; GREEN et al., 1998). Dentre eles, encontra-se a técnica de ATP bioluminescência, que se baseia na determinação da quantidade de ATP presente sobre as superfícies avaliadas, seja ATP de origem microbiana ou não (TYDRICH, 1996; KENNEDY e OBLINGER, 1985; GRIFFITHS, 1993; GIESE, 1995).

A técnica de ATP bioluminescência consiste em remover os resíduos da superfície, geralmente com swab esterilizado, colocando-os em contato com o complexo enzimático luciferina/ luciferase, obtido da cauda do vaga-lume *-Photinus pyralis* (GRIFFITHS, 1993; GIESE, 1995; VELAZQUEZ e FEIRTAG, 1997). A enzima luciferase utiliza a energia química contida na molécula de ATP para conduzir a descarboxilação oxidativa da luciferina, resultando na emissão de luz, e para cada ATP um fóton de luz é emitido (HAWRONSKYJ e HOLAH, 1997; GIESE, 1995). A atividade ótima ocorre em pH 7,75 e a temperaturas de 18-22°C (TYDRICH, 1996). O esquema a seguir mostra a formação de luz:



Como o ATP está presente tanto em organismos vivos quanto em resíduos orgânicos e, ainda, como ATP livre, a determinação de ATP microbiano depende da eficiência da separação da bactéria do resíduo orgânico, seguida da extração e medida do ATP microbiano, ou da extração seletiva e destruição enzimática do ATP não-microbiano, seguidas pela extração e medida do ATP microbiano (KENNEDY e OBLINGER, 1985; GIESE, 1995; TYDRICH, 1996).

A luz emitida é medida em um aparelho conhecido como luminômetro, que normalmente consiste de um fotomultiplicador e um amplificador unido a um registrador, sendo os resultados geralmente

expressos em unidades relativas de luz (URL) (HAWRONSKYJ e HOLAH, 1997).

Esta técnica está sendo utilizada pelas indústrias de alimentos, de bebidas, como cervejarias, de laticínios, entre outros, para a detecção de bactérias contaminantes e também na avaliação do processo de higienização empregado (GRIFFITHS, 1993; VELAZQUEZ e FEIRTAG, 1997; KENNEDY e OBLINGER, 1985; TYDRICH, 1996). Contaminantes químicos, como resíduos de agentes de limpeza e sanificantes presentes nas superfícies, podem mudar a quantidade de luz emitida ou detectada, pois possuem compostos como surfactantes, sais, corantes e íons metálicos, que podem interferir na reação enzimática (VELAZQUEZ e FEIRTAG, 1997; GREEN et al., 1998).

VELAZQUEZ E FEIRTAG (1997) avaliaram o efeito de hipoclorito de sódio comercial nas concentrações de 100 a 50.000 mg/L de cloro residual livre (CRL), com pH variando de 7,22 a 12,14 e de 25 a 800 mg/L de um composto quaternário de amônia com pH entre 5,81 e 6,25 sobre 10^8 UFC/mL de *Escherichia coli* O157:H7. Observaram que o hipoclorito de sódio mostrou-se efetivo contra *E. coli* O157:H7 a partir de concentrações de 10.000 mg/L de CRL. Os resíduos da concentração de 100 mg/L de CRL aumentaram ligeiramente a medida de URL e não detectaram diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre os resíduos da concentração de 500 e 1.000 mg/L de CRL com o controle. Somente os resíduos das concentrações de 10.000 a 50.000 mg/L de CRL diminuíram o sinal de ATP bioluminescência. Assim, como os resíduos das baixas concentrações (100, 500 e 1.000 mg/L de CRT) não diminuíram a medida de URL e também não foram efetivos contra *E. coli* O157:H7, se esses microrganismos estivessem presentes na superfície, eles seriam detectados na análise, exigindo um novo processo de higienização. O composto quaternário de amônia provocou aumento de 10% da medida de URL nas concentrações usadas e foi efetivo contra o microrganismo somente a 800 mg/L, não constituindo um risco, pois a superfície seria considerada suja e necessitaria de um processo de higienização mais intensivo.

GREEN et al. (1998), ao avaliarem hipoclorito de sódio nas concentrações de 30, 50 e 70 mg/L de CRL e um composto quaternário de

amônia a 10, 20 e 30 mg/L, verificaram que os dois sanificantes não influenciaram a medida de URL, não havendo diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre a emissão de luz do controle e a das amostras utilizando esses sanificantes.

2.4.2. Sanificantes químicos

A maioria dos sanificantes químicos é agente oxidante. Assim, pode ter suas atividades reduzidas por compostos inorgânicos e orgânicos presentes no meio a ser tratado. Em inativação química de microrganismos, o mais importante não é a quantidade de substância química aplicada, mas o residual desta no meio depois de a demanda ter sido suprida (WICKRAMANAYAKE e SPROUL, 1991).

Há grande variedade de sanificantes disponíveis no mercado. No entanto, a maioria apresenta pequeno efeito sobre a viabilidade dos esporos bacterianos, sendo poucos aqueles com atividades esporicidas (RUSSELL, 1991). Dentre os sanificantes que apresentam esta atividade, encontram-se os compostos clorados, o peróxido de hidrogênio e o ácido peracético (RUSSELL, 1991), sendo estes amplamente utilizados pelas indústrias de alimentos (TROLLER, 1993; ANDRADE e MACÊDO, 1996).

Os esporos são mais resistentes aos sanificantes que as células vegetativas (TROLLER, 1993; ANDRADE e MACÊDO, 1996). Essa resistência é dependente dos valores de pH, da concentração, da temperatura, dos tipos de sanificantes e dos tempos de contato (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

2.4.2.1. Compostos clorados

Os compostos clorados são os sanificantes mais largamente usados, porque possuem custos relativamente baixos, além de serem fáceis de preparar e aplicar, eficazes para destruir bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim como bolores e esporos bacterianos, e não serem afetados pela água dura. No entanto apresentam desvantagens, como corrosão, quando usados incorretamente; são afetados pela matéria orgânica; podem

provocar irritação na pele; e causar alterações de sabor nos alimentos (GAVA, 1998; GIESE, 1991).

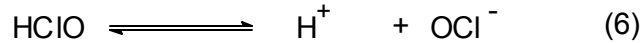
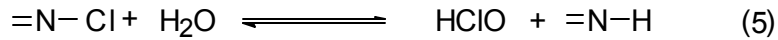
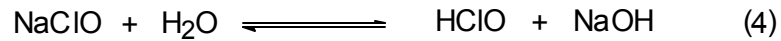
Vários compostos à base de cloro orgânico e inorgânico estão disponíveis no mercado (ANDRADE e MACÊDO, 1996; DYCHDALA, 1991). Dentre os compostos orgânicos destacam-se a cloramina T, dicloramina T, diclorodimetilhidantoína, ácido tricloroisocianúrico, ácido dicloroisocianúrico. Em relação aos compostos inorgânicos, podem ser destacados o cloro gás, o dióxido de cloro e os hipocloritos de sódio, de cálcio ou de lítio; dentre estes, o hipoclorito de sódio (NaClO), comercializado sob a forma líquida, em teores de 1 a 10%, é o mais usado.

Os compostos clorados inorgânicos apresentam ação mais rápida e eficiente, tendo como principal desvantagem o alto poder corrosivo, quando usado incorretamente. Já os compostos clorados orgânicos, ou cloraminas orgânicas, são mais estáveis ao armazenamento e também em solução aquosa, o que implica uma liberação mais lenta do ácido hipocloroso, permanecendo efetivos por mais tempo. Estes são menos reativos com a matéria orgânica e formam menores quantidades de trihalometanos, sendo, no entanto, mais caros (ANDRADE e MACÊDO, 1996; DYCHDALA, 1991).

Os fatores que afetam a atividade biocida dos compostos clorados, sozinhos ou em combinação, são o pH, a concentração, a temperatura e a presença de matéria orgânica, de amônia e compostos amoniacais, de iodo ou bromo (DYCHDALA, 1991; TROLLER, 1993).

O mecanismo de ação dos compostos clorados orgânicos e inorgânicos, com exceção do dióxido de cloro, é semelhante: quando estão em solução aquosa, liberam ácido hipocloroso, em sua forma não-dissociada, que apresenta ação antimicrobiana (ANDRADE e MACÊDO, 1996; MARRIOTT, 1995; TROLLER, 1993; MEYER, 1994; GIESE, 1991). O dióxido de cloro não se hidrolisa em solução aquosa e o agente ativo é a molécula inteira (ANDRADE e MACÊDO, 1996; MARRIOTT, 1995).

As hidrólises dos compostos clorados inorgânicos e das cloraminas orgânicas e a dissociação do ácido hipocloroso estão apresentadas nas equações 3, 4, 5 e 6 (TROLLER, 1993; ANDRADE e MACÊDO, 1996; MEYER, 1994).



A concentração de ácido hipocloroso é determinada pelo pH, pela constante de dissociação ($\text{pK}_a = 7,5$ a 30°C) e pela concentração em cloro residual livre da solução. Esses fatores podem ser relacionados num rearranjo da equação de Henderson-Hasselbalch (equação 7):

$$\text{mg/L de HClO} = \frac{\text{mg/L de cloro residual livre}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pK}_a}} \quad (7)$$

em que

pH = pH da solução utilizada; e

$\text{pK}_a = 7,5$ (pK_a do ácido hipocloroso).

A atividade antimicrobiana aumenta com a diminuição do pH, pois ocorre a formação de ácido hipocloroso na presença de íons H^+ . Já o aumento do pH diminui a atividade antimicrobiana, devido ao fato de a reação ocorrer na direção inversa na presença de $(\text{OH})^-$, prevalecendo o íon hipoclorito (GIESE, 1991; DYCHDALA, 1991).

Existem muitas hipóteses para o mecanismo da atividade do cloro sobre as células vegetativas (DYCHDALA, 1991; ANDRADE e MACÊDO, 1996; MARRIOTT, 1995; TROLLER, 1993):

- Na forma não-dissociada, penetra através da membrana celular e oxida os grupos sulfidrílicos ($-\text{SH}$) de certas enzimas importantes da via glicolítica, inibindo-a.
- Forma compostos Nclorados tóxicos pela combinação do cloro com proteínas da membrana celular.

- Causa danos à membrana, dificultando o transporte de carboidratos e de aminoácidos, podendo resultar no extravasamento de compostos celulares.
- Provoca a descarboxilação oxidativa de aminoácidos, formando nitrilas e aldeídos.
- Reage com DNA, oxida bases purínicas e pirimidínicas e paralisa a síntese protéica.
- Inibe a captação de oxigênio e fosforilação oxidativa junto com vazamento de algumas macromoléculas.
- É o causador de aberrações cromossômáticas.

Os mecanismos precisos de ação esporicida ainda são pouco compreendidos (RUSSELL, 1991; BLOOMFIELD e ARTHUR, 1989).

ANDRADE e MACÊDO (1996) sugerem duas teorias que tentam explicar o mecanismo de ação do cloro sobre os esporos, e ambas envolvem a cobertura do esporo. Uma sugere que o cloro se combina e remove proteínas da cobertura e de camadas subseqüentes, o que conduz a aumento da permeabilidade ao agente químico e da suscetibilidade à destruição. Já a outra propõe que o cloro estimula a germinação por meio da alteração da permeabilidade da cobertura e, em seguida, inativa o esporo germinado.

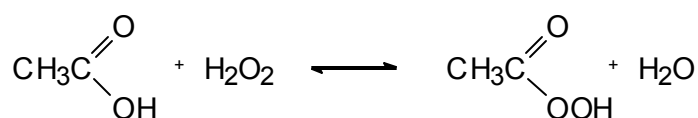
Outros pesquisadores propõem que a degradação do córtex do esporo, além da cobertura, é uma parte integrante do processo que permite a penetração do cloro em seu local de ação no protoplasma (BLOOMFIELD e ARTHUR, 1989; RUSSEL, 1991). O córtex tem uma função de proteção rígida e também é responsável por manter baixo nível de água e, conseqüentemente, alta viscosidade no protoplasma, sendo a difusão de agentes antimicrobianos dificultada. No entanto, com a degradação do córtex por agentes germinantes ou por ação do cloro, permite-se a passagem da água e difusão de cloro no protoplasma, causando a morte das células pela oxidação de constituintes celulares dentro do protoplasma ou membrana do esporo (BLOOMFIELD e ARTHUR, 1989).

Recomenda-se, geralmente, uma concentração de 100 mg/L de cloro residual livre, quando a sanificação é realizada por imersão ou circulação por 15 a 30 minutos de contato, e de 200 mg/L, quando o processo é por aspersão,

ou nebulização com um tempo de contato de 15 a 20 minutos (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

2.4.2.2. Ácido peracético

O ácido peracético é produzido pela reação de ácido acético ou anidrido acético com peróxido de hidrogênio na presença de ácido sulfúrico, que age como catalisador (BLOCK, 1991).



Para prevenir a reação inversa, a solução de ácido peracético apresenta em sua formulação, além do ácido acético e do peróxido de hidrogênio, um estabilizante. Este pode ser um agente seqüestrante (pirofosfato de sódio) ou um agente quelante (8- hydroxyquinoline), que remove traços de metais, os quais aceleram a decomposição de peróxidos (BLOCK, 1991).

As indústrias de alimentos, bebidas e laticínios têm aplicado amplamente o ácido peracético, que é um agente antimicrobiano mais potente que o peróxido de hidrogênio, por não ser afetado pela presença de catalase (RUSSELL, 1991). Apresenta excelente ação sobre bactérias gram-positivas, gram-negativas, bolores, vírus e esporos bacterianos (TROLLER, 1993; BLOCK, 1991; KRAMER, 1997). É ativo em temperaturas baixas: por exemplo, a uma concentração de 30.000 mg/L é ativo a -40°C e mata esporos em um minuto a 0°C; também é ativo em temperaturas altas (85°C). Além disso, permanece efetivo na presença de matéria orgânica, decompõe-se em produtos não-tóxicos ao meio ambiente; no entanto, é afetado pelo pH, apresentando maior atividade em pH baixo (BLOCK, 1991).

É provável que o mecanismo de ação do ácido peracético esteja relacionado com a oxidação das ligações dissulfeto e grupos sulfidrilas das enzimas (BLOCK, 1991). Sugere-se também que o ácido peracético interfere em processos metabólicos e na função quimiosmótica da membrana citoplasmática, podendo causar o rompimento desta (BLOCK, 1991).

2.4.3. Técnicas para a avaliação da eficiência microbiológica de sanificantes

O *B. sporothermodurans* tem a capacidade metabólica de formar esporos, que são mais resistentes a agentes químicos que as células vegetativas. Assim, a determinação do melhor sanificante e das condições de higienização para sua eliminação de superfícies de equipamentos e utensílios, que entram em contato com o alimento, é importante para o controle da presença deste microrganismo no produto final.

Avaliar microbiologicamente as formulações de sanificantes químicos é fundamental, pois apenas a determinação da concentração do princípio ativo não é suficiente para medir o seu poder de destruição microbiana (ANDRADE e MACÊDO, 1996). Diversas técnicas são descritas, sendo classificadas em testes laboratoriais, testes em uso e testes em uso simulado (BERUBE e OXBORROW, 1991).

A eficiência do sanificante sob condições de laboratório pode ser consideravelmente diferente daquela do uso (BERUBE e OXBORROW, 1991). O teste em uso simulado, quando adequadamente elaborado, apresenta resultados que refletem melhor as condições da indústria (ANDRADE e MACÊDO, 1996). A transferência das condições da indústria para o laboratório, muitas vezes, exige o desenvolvimento de metodologias e equipamentos para simular as diversas formas de usos dos sanificantes; portanto, são mais trabalhosos e exigem criatividade (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

Nesses testes, após a sanificação, os microrganismos são removidos das superfícies e recuperados. A remoção pode ser feita utilizando o método do swab, com alginato de sódio ou algodão, rinsagem com água destilada ou soluções apropriadas, e método de placas de contato (tipo RODAC-Replicate Organism Direct Ágar Contact). A recuperação é realizada conforme processos usuais de contagem, usando neutralizantes adequados para a avaliação (ANDRADE e MACÊDO, 1996).

Stone e Zottola, citados por ZOTTOLA (1997), desenvolveram um sistema CIP (Cleaning In Place) portátil, de aço inoxidável, com 3,5 m de tubulação, uma bomba positiva e um tanque de equilíbrio, onde foi adicionado leite

inoculado com $1,0 \times 10^3$ UFC/mL *Pseudomonas fragi* ATCC 4973 e circulado pelo sistema a uma vazão de 30 L /minuto. O intuito deste trabalho foi verificar o efeito de dois procedimentos CIP sobre a adesão deste microrganismo ao aço inoxidável. Quando concentrações adequadas de agentes de limpeza e sanificante, assim como de temperatura, foram usadas, *P. fragi* aderidos eram inativados e o biofilme removido. Sob condições abaixo da ótima de limpeza e sanificação, os microrganismos aderidos não eram removidos ou inativados. Quando o intervalo entre a limpeza e a sanificação excedia oito horas, o número de microrganismos aderidos aumentava a um ponto que podiam resistir à inativação pela limpeza e sanificação.

KRYSINSKI et al. (1992) avaliaram o efeito de agentes de limpeza e sanificantes sobre *Listeria monocytogenes* aderidos em torno de $2,0 \times 10^4$ UFC por cm^2 em cupons de 1 cm^2 de aço inoxidável, poliéster e poliéster/poliuretano, após 24 horas de contato a 25°C . Depois da incubação, os cupons eram rinsados sob agitação por 10 segundos em 10 mL de tampão fosfato, para remover os microrganismos não aderidos; em seguida, um cupom era exposto a 10 mL do agente de limpeza ou sanificante por 10 minutos, sem agitação. Após esse procedimento, eram rinsados com 10 mL de neutralizante por dois minutos e enumerados por contagem em placa em ágar BHI, a 35°C , por 24 horas. A resistência de *L. monocytogenes* aderidas a sanificantes era dependente da superfície estudada, sendo maior sobre poliéster/poliuretano, seguida pelo poliéster e aço inoxidável. Remoção e/ou inativação completa foram obtidas, em muitos casos, quando a superfície era primeiro submetida à limpeza antes da sanificação.

GÂNDARA e OLIVEIRA (2000) elaboraram um modelo para simulação da adesão de uma linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em placas de pasteurizador e estudaram os efeitos da higienização na sua remoção. Esse modelo é constituído por um frasco de vidro de 12,5 cm de altura x 13 cm de diâmetro, agitador, banho-maria bacteriológico a 45°C e placas de aço inoxidável AISI 316, medindo 20 x 100 mm, com a área-teste delimitada por ranhuras; as placas eram penduradas por ganchos nas bordas do frasco, cobrindo toda a parede e tornando-as fixas nessas posições. As placas foram submersas em 1.500 mL de leite desnatado

reconstituído esterilizado, sob uma agitação de 550 rpm e a 45°C foram inoculados com 100 UFC/mL do microrganismo, mantendo-se a agitação por seis horas. Avaliaram a adesão nos tempos de zero, três e seis horas. Nesses tempos de contato, as concentrações de células aderidas variaram na terceira hora de 15,8 UFC/cm² para 1,9 x 10⁴ UFC/cm² na sexta hora, não sendo detectada adesão do microrganismo no tempo zero. A fim de avaliar o efeito da higienização, os agentes de limpeza, os sanificantes e a água foram utilizados sob agitação de 900 rpm, realizando-se contagem dos microrganismos em cada etapa da higienização, utilizando-se swab por 20 segundos para remoção dos microrganismos e meio de cultura adequado para o crescimento. Quando se realizaram as etapas de limpeza alcalina, ácida e sanificação com hipoclorito de sódio, contendo 100 mg/L de CRT, nas placas após seis horas de incubação não se detectou presença deste microrganismo na superfície.

MELLO (1997) utilizou um modelo de aço inoxidável de circulação de linha de leite para avaliar a eficiência de sanificantes químicos sobre um psicrotrofico acidificante isolado de leite cru aderido neste equipamento. Este modelo era constituído de 5,8 m de tubulação de 1 polegada (2,54 cm) de diâmetro interno, um tanque de equilíbrio de 25 litros e uma bomba centrífuga de ½HP, que impulsionava as soluções pelo sistema. Em pontos específicos, foram instalados seis cupons de prova: dois com formatos de T, dois com formato cilíndrico e dois com formato de curva, com áreas superficiais internas de 108,06 cm², 87,8 cm² e 52,74 cm², respectivamente. Inoculou-se a suspensão do microrganismo nos seis cupons e em três deles fez-se a contagem do número de células aderidas inicialmente, removendo-as por meio da rinsagem com solução esterilizada de tampão fosfato Butterfield por 15 minutos e plaqueada por profundidade em meio próprio a 28°C, por 48 horas. Posteriormente, elas foram colocadas no sistema-modelo junto com os outros três, que foram avaliados após a sanificação CIP, utilizando o mesmo procedimento de rinsagem por 15 minutos para remover os microrganismos sobreviventes com solução esterilizada de tampão fosfato Butterfield acrescida de um neutralizante adequado para cada sanificante, e enumerados pela mesma técnica de contagem, tempo e temperatura de incubação. Verificou-se adesão deste microrganismo ao aço inoxidável e que a eficiência dos

sanificantes químicos variou conforme os cupons de prova. Para os cupons em T, foram eficientes as soluções de ácido peracético (7,95 RD), dicloroisocianurato de sódio (7,62 RD) e amônia quaternária (6,95 RD). Para os cupons em cotovelo 45°, foram aprovadas as soluções de ácido peracético (7,44 RD), amônia quaternária (7,01 RD), dicloroisocianurato de sódio (6,44 RD) e hipoclorito de sódio (5,50 RD). Os sanificantes aplicados em cupons de prova cilíndricos mostraram menor eficiência, com valores inferiores a 5 RD. Além disso, foi circulado água para verificar a remoção mecânica, concluindo que o uso de sanificante químico é imprescindível para o controle do psicrotrofico acidificante em indústria de laticínios.

3- MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Higiene Industrial do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa.

3.1. Soluções sanificantes

Todas as soluções sanificantes avaliadas pelo teste em uso simulado foram preparadas a partir de produto comercial concentrado. Utilizou-se o hipoclorito de sódio da ABC/Itaperuna, contendo cerca de 8,6% de cloro residual total (CRT), expresso em Cl_2 , e pH 13,45; o clorado orgânico SUMAVEG/Lever Industrial, contendo 3% de CRT, expresso em Cl_2 ; e o ácido peracético Vortexx/ECOLAB com cerca de 3% de ácido peracético, 6,3% de peróxido de hidrogênio e pH em torno de 1,3. As concentrações das soluções utilizadas de cada sanificante são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1- Concentração e pH das soluções sanificantes preparadas a partir de produto comercial concentrado

Sanificante	Concentração	pH solução
Hipoclorito de sódio	100 mg/L de CRT, expressos em Cl ₂	9,45, 8,0 e 7,0
Dicloro s. triazinatriona sódica diidratada (cloramina orgânica)	100 e 60 mg/L de CRT, expressos em Cl ₂	7,18
Ácido peracético	60 e 30 mg/L	3,4 e 3,7

CRT = cloro residual total.

O pH da solução de hipoclorito de sódio, contendo 100 mg/L de CRT, foi corrigido para pH 8,0 e 7,0 com ácido nítrico concentrado a 70% P.A.

As concentrações de cloro residual total, expressas em Cl₂, das soluções de hipoclorito de sódio e da cloramina orgânica foram determinadas pelo método iodométrico (GREENBERG et al., 1992). As concentrações de ácido peracético e de peróxido de hidrogênio no produto comercial Vortexx, foram determinadas por iodometria e permanganometria, respectivamente, seguindo metodologia do fabricante (ECOLAB, 1999). Para obter as concentrações de ácido peracético e peróxido de hidrogênio no produto comercial, utilizaram-se as equações 8 e 9, a seguir:

$$\% \text{ Ácido peracético} = \frac{T \times f \times 0,38027}{P.A.} \quad (8)$$

$$\% \text{ Peróxido de hidrogênio} = \frac{P \times f \times 0,8504}{P.A.} \quad (9)$$

em que

P = consumo de permanganato de potássio 0,5N, em mL;

T = consumo de tiosulfato de sódio 0,1N, em mL;

f = fator de correção do permanganato de potássio;

f' = fator de correção do tiosulfato de sódio; e

P.A. = peso da amostra em gramas.

Para determinar a concentração nas soluções diluídas de ácido peracético, utilizou-se a equação 10:

$$\% \text{ Vortexx} = Vg \times f \times 0,0532 \quad (10)$$

em que

Vg = volume gasto de tiosulfato de sódio 0,1N;

f = fator da solução de tiosulfato de sódio 0,1N; e

0,0532 = fator médio de correção de ácido peracético concentrado.

Todas as soluções foram circuladas à temperatura ambiente (20-25°C), pelo tempo de circulação de 15 minutos e a uma velocidade de 1,5 m/s nos cupons de prova, obtida a partir de uma vazão estimada de 25,65 L/ minuto e considerando o diâmetro do tubo de 0,01905 m.

Além desses sanificantes, foi utilizada a água esterilizada para avaliar a remoção mecânica dos esporos aderidos.

3.2. Suspensão de esporos

A suspensão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* foi obtida a partir da cultura CCT 6247, cedida, pelo prof. Mauro F. F. Leitão, da FEA/UNICAMP, Campinas-SP, ao Instituto de Laticínios Cândido Tostes (ILCT)- EPAMIG, Juiz de Fora-MG, que gentilmente forneceu a cepa para a execução desta pesquisa.

Esta cultura era mantida em tubo de ensaio com tampa rosqueável a -18° C em ágar BHI (Brain Heart Infusion), acrescido de 1g/L de esculina e 0,5 g/L de citrato férrico amoniacal.

A ativação foi efetuada por meio de três repicagens consecutivas, pela técnica de estriamento em ágar BHI (MERCK), acrescido de 1g/L de esculina (REAGEN) e 0,5 g/L de citrato férrico amoniacal, solidificado na posição inclinada, em tubo de ensaio de 15 x 160 mm, sendo incubado a 37° C por 48 horas. Em seguida, 1 mL de solução tampão fosfato, 0,31M em pH 7,0 ±

0,1(ICSMT, 1978), foi adicionado nestes tubos e agitados manualmente para obter uma suspensão de células vegetativas, que foram inoculadas em volumes de 1 mL na superfície de 250 mL de meio de esporulação - 3,0 g de extrato de carne, 5,0 g de triptona, 1 g de amido, 10 mg de sulfato de manganês e 20,0 g de ágar em 1.000 ml de água destilada e pH final entre 6,9 e 7,1 - contidos em quatro garrafas de Roux de 800 mL.

A formação de esporos foi acompanhada por observação ao microscópio de contraste de fase da marca Olympus BX 40, até se obter-se cerca de 90-95% de esporulação. A incubação prolongou-se por cerca de nove dias a 37°C, para se obter a esporulação desejada.

Após o período de incubação, os esporos foram removidos do meio de esporulação, usando-se em torno de 20 mL de água destilada esterilizada, e coletados em tubos de centrifugação JA-20 (Beckman, modelo J2-MC). A centrifugação foi realizada a 3.000xg (5.000 rpm) por 10 minutos, a uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi descartado e os sedimentos com os esporos ressuspensos em água destilada esterilizada, para nova centrifugação. Este processo foi repetido por quatro vezes. Ao final, os esporos de cada tubo de centrifuga foram suspensos em glicerol e tampão fosfato 0,31M em pH7,0 ± 0,1 (15:85) e acondicionados em volumes de 1 mL, em tubos de Eppendorf. Após a confirmação do número de esporos no lote, que se encontrava em torno de $7,3 \times 10^7$ esporos/mL, por meio da contagem em placa, pela técnica de espalhamento superficial com alça de Drigalsky, em ágar BHI e incubação a 37°C por 24 horas, os tubos de Eppendorf eram armazenados a -18°C até o momento do uso.

3.3. Descrição do modelo de linha de circulação de leite

A fim de verificar a capacidade de adesão de esporos de *B. sporothermodurans* em aço inoxidável e a eficiência de sanificantes usados na indústria de laticínios, foi utilizado um modelo de linha de circulação de leite (Figura 1) em aço inoxidável, que se encontrava no laboratório onde foi conduzido o experimento. O modelo foi constituído por uma tubulação de ¾ de polegada de diâmetro interno (0,01905 m) e comprimento total de 5,8 m, por onde circula o sanificante, e de um tanque de 25 litros, que foi utilizado como reservatório de sanificante, o qual se apresentou acoplado a uma bomba

centrífuga de ½HP, para impulsionar o sanificante pelo sistema. Em pontos específicos da tubulação, foram instalados cupons de prova com formatos de cotovelo 90°, em T e cilíndricos. As áreas superficiais internas dos cupons de prova eram: 108,06 cm² para cupons em formato T, 84,69 cm² para os cupons cilíndricos e 52,74 cm² para cupons em formato de cotovelo 90°.

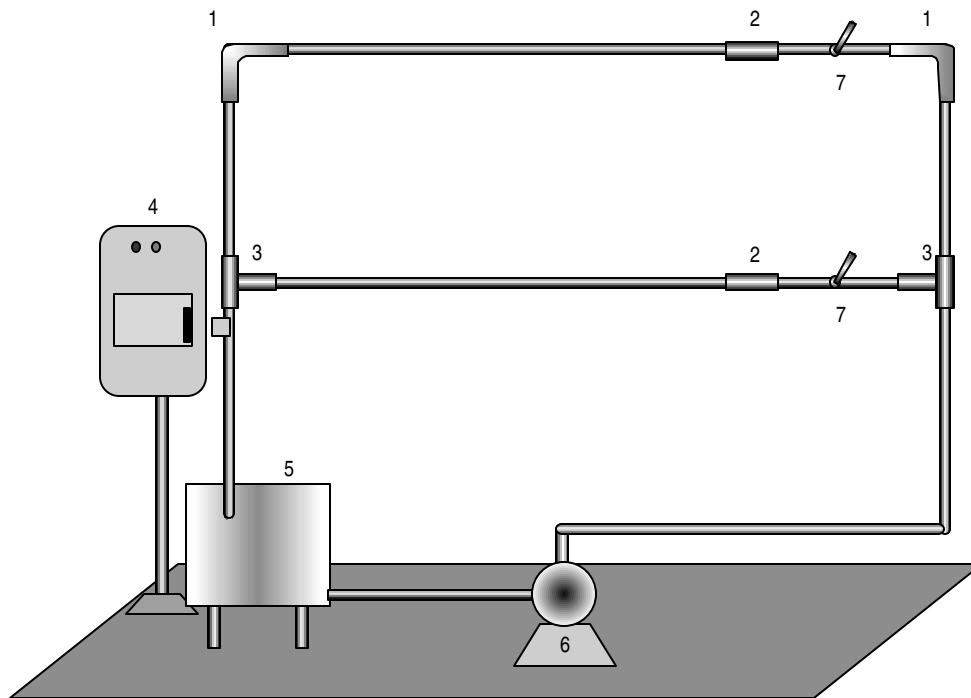


Figura 1- Modelo de linha de circulação de leite (1-cupom de prova cotovelo 90°; 2-cupom de prova cilíndrico; 3-cupom de prova T; 4-controle de potência; 5-tanque cilíndrico; 6-bomba centrífuga; 7-controle de vazão).

3.4. Adesão da suspensão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* CCT6247

3.4.1. Preparo dos cupons de prova

Foi realizada limpeza CIP (Cleaning In Place) no modelo de linha de circulação de leite, utilizando 1% de soda cáustica (NaOH) circulada à temperatura de 80°C por 20 minutos, a uma velocidade de 1,5 m/s. Em seguida, enxaguou-

se com água à temperatura ambiente (20-25°C), até reação negativa com solução de fenolftaleína. Depois disso, iniciou-se o processo de sanificação com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a uma concentração de 100 mg/L de cloro residual total, em pH $7 \pm 0,1$, expressa em C_{b} , circulada por 15 minutos à temperatura ambiente, a uma velocidade de 1,5 m/s. Enxaguou-se com água à temperatura ambiente até se obter coloração amarelo-clara em teste de ortotolidina 0,1%, que corresponde a cerca de 0,1 mg/L CRL, expresso em C_{b} .

O equipamento foi desmontado após o fluxo ser regulado para a velocidade de 1,5 m/s. Os cupons de prova e as demais partes foram esterilizadas a 121°C por 15 minutos, com exceção do tubo de maior comprimento (± 80 cm) e as duas válvulas reguladoras de fluxo. Estas válvulas não foram esterilizadas, para não serem desreguladas. O tubo foi esterilizado quimicamente, utilizando solução de hipoclorito de sódio a 100 mg/L de cloro residual total, em pH $7 \pm 0,1$, por 10 minutos de contato, sendo em seguida enxaguado com água à temperatura ambiente (20-25°C).

3.4.2. Adesão dos esporos

Os esporos contidos no tubo de Eppendorf armazenado a -18°C foram descongelados e em seguida diluídos em 400 mL de solução tampão fosfato, 0,31 M em pH $7,0 \pm 0,1$, esterilizada, para se obter uma suspensão contendo cerca de 10^5 esporos/mL. Esta suspensão foi adicionada no interior dos seis cupons de prova previamente esterilizados em volumes de 27, 49 e 57 mL, para os cupons cotovelo 90° (2), cilíndrico (2) e T (2), respectivamente. Rolhas de borracha esterilizadas foram colocadas nas extremidades de cada cupom de prova, para conter a suspensão bacteriana adicionada no interior dos cupons. Os esporos na suspensão permaneceram em adesão por cerca de 12 horas a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; em seguida, a suspensão foi descartada em recipientes esterilizados individuais para os diferentes cupons de prova, ou seja, um recipiente para coletar as suspensões dos cupons de prova em forma de cotovelo 90°, um para os cupons cilíndricos e um para os cupons em T. Estas suspensões foram plaqueadas em ágar BHI pela técnica de espalhamento superficial e

incubadas a 37°C por 24 horas. Os resultados foram multiplicados pelos respectivos volumes de suspensão adicionados nos diferentes cupons, obtendo-se assim o número de esporos presentes na suspensão descartada. Somando-se o número de esporos presentes nessa suspensão com o número de esporos aderidos nos cupons, obteve-se o número total de esporos presentes na suspensão preparada, o que possibilitou calcular a porcentagem de esporos aderidos nos cupons de prova.

Os cupons foram novamente enchidos com água destilada esterilizada, que permaneceu dentro dos cupons por dois minutos, sendo depois descartada. Esse último processo visou eliminar células planctônicas, ou seja, que não estavam aderidas à superfície. Em três cupons (um cotovelo 90°, um cilíndrico e um T) foram determinados o número de esporos aderidos antes da sanificação; os outros três foram conectados ao equipamento, para a etapa de sanificação e posterior determinação do número de esporos sobreviventes.

3.5. Avaliação da eficiência dos sanificantes químicos

A eficiência dos agentes químicos foi avaliada por meio da determinação do número de reduções decimais na população de *B. sporothermodurans*, obtido pela diferença entre o logaritmo decimal das células aderidas e o logaritmo das células sobreviventes, determinada por contagem em placas usando ágar BHI e incubação a 37°C por 24 horas.

Para recuperar os microrganismos aderidos nos cupons, foi utilizada a técnica da rinsagem, utilizando volumes de 20, 30 e 40 mL de solução para rinsagem nos cupons cotovelo 90°, cilíndrico e T, respectivamente, com agitação por 15 minutos. Ao final do período de incubação, três dos seis cupons (um cotovelo 90°, um cilíndrico e um T) foram rinsados com solução tampão fosfato, 0,31 M em pH 7,0 ± 0,1 (ICSMF, 1978), para determinar o número de esporos aderidos antes da sanificação. Após a rinsagem, foram esterilizados quimicamente com solução de hipoclorito de sódio a 100 mg/L de cloro residual total (CRT), em pH 7,0 ± 0,1, por 10 minutos de contato, e escovados por cerca de um minuto, sendo em seguida enxaguados com água à temperatura ambiente (20-25°C) e conectados ao sistema-modelo de circulação de linha de leite.

Depois da circulação dos sanificantes durante 15 minutos à temperatura ambiente (20-25°C), os outros três cupons acoplados ao modelo também foram rinsados com solução tampão fosfato 0,31 M em pH $7,0 \pm 0,1$, mas acrescida de 0,25% de tiosulfato de sódio, para neutralizar a ação do sanificante e recuperar os esporos sobreviventes.

Depois das rinsagens, realizou-se a contagem de esporos aderidos pela técnica de espalhamento superficial em ágar BHI, em duplicata, inoculando-se 0,1 mL das soluções das amostras ou das diluições usadas. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

As colônias enumeradas foram multiplicadas pela respectiva diluição e pelo volume da solução de rinsagem, a fim de determinar o número de esporos aderidos nos cupons, sendo esses números divididos pela área superficial interna desses cupons, podendo-se, assim, expressar os resultados em UFC/cm² de esporos de *B. sporothermodurans*.

Para determinar o número de reduções decimais (RD), foi realizado o seguinte cálculo:

$$RD = \log N_0 - \log N_f$$

em que

N_0 = número de esporos de *B. sporothermodurans* aderidos aos cupons de prova antes da sanificação; e

N_f = número de esporos de *B. sporothermodurans* aderidos aos cupons de prova após sanificação.

3.6. Avaliação da higienização dos cupons de prova pela técnica de ATP bioluminescência

A avaliação da higienização dos cupons de prova foi efetuada usando-se a técnica de ATP bioluminescência, com metodologia e equipamento Biotrace Xcel (BIOTRACE/ Manual técnico, 2000).

Avaliaram-se os cupons de prova em diferentes situações:

- a) Após a higienização CIP completa, ou seja, incluindo as etapas de pré-lavagem, lavagem alcalina com NaOH a 1%, sanificação com hipoclorito de sódio, contendo 100 mg/L em pH 7,0, e, ainda, esterilização a 121°C por 15 minutos.
- b) Após a adesão de esporos de *B. sporothermodurans* aos cupons depois de 12 horas de incubação a 30°C ± 2°C com a suspensão de *B. sporothermodurans*, contendo 10⁵ esporos/ mL.
- c) Ao término da sanificação CIP, utilizando solução de ácido peracético, contendo 60 mg/L por 15 minutos a uma velocidade de 1,5 m/s e enxágüe com água à temperatura ambiente (20-25°C) por três minutos. Para esta avaliação, usou-se a metodologia igual à mostrada no item 3.5 antes da realização do swab nos cupons de prova.

Em todas as situações, foram efetuadas 10 voltas com o swab na superfície interna dos seis cupons de prova (dois em forma de cotovelo 90°, dois cilíndricos e dois em forma de T) de uma extremidade para outra, no sentido de dentro para fora. Nos cupons em forma de T, o swab foi realizado somente na extensão cilíndrica, não se avaliando a bifurcação.

Após a coleta na superfície, o swab era colocado na cubeta, entrando em contato com os reagentes. A agitação era realizada manualmente em forma circular por 20 segundos, sendo posteriormente adicionado no luminômetro, obtendo-se a leitura em cerca de 10 segundos, devidamente registrada em papel acoplado no aparelho.

A superfície pode ser considerada limpa quando apresenta resultados menores que 150 URL (<150 URL), sendo suspeita no intervalo de 150 a 299 URL e suja acima de 300 URL (>300 URL), quando avaliada pelo equipamento Biotrace Xcel (BIOTRACE/ Manual Técnico, 2000).

3.7. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido em parcelas subdivididas, tendo nas parcelas sete sanificantes e a água e, nas subparcelas, os três tipos de cupons de prova, totalizando 24 tratamentos, segundo um delineamento inteiramente casualizado, realizado em três repetições. O programa estatístico utilizado para realizar a análise estatística foi o SAEG 8.0.

As diferenças das reduções decimais do esporo de *B. sporothermodurans* entre os sanificantes foram analisadas por meio de análise de variância, em nível de 5% de probabilidade.

Para as comparações de interesse entre os sanificantes, foi realizado contraste das médias do número de reduções decimais dos cupons de prova, em nível de 5% de probabilidade. Foram estabelecidos os seguintes contrastes (Quadro 2):

- Contraste 1 (C1): comparar o desempenho da água e dos produtos químicos: hipoclorito de sódio (pH 9,45; 8,0; e 7,0), cloramina orgânica (100 e 60 mg/L) e ácido peracético (60 e 30 mg/L), na remoção dos esporos.
- Contraste 2 (C2): comparar a eficiência entre o hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT em pH 9,45 e as demais soluções sanificantes: hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT em pH 8,0 e 7,0, cloramina orgânica a 100 e 60 mg/L de CRT e ácido peracético a 60 e 30 mg/L.
- Contraste 3 (C3): comparar a eficiência entre hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT em pH 8,0 e em pH 7,0.
- Contraste 4 (C4): comparar a eficiência entre as soluções de hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT em pH 8,0 e 7,0, cloramina orgânica a 100 e 60 mg/L de CRT e ácido peracético a 60 e 30 mg/L.
- Contraste 5 (C5): comparar a eficiência entre as soluções de cloramina orgânica a 100 e 60 mg/L de CRT e as soluções de ácido peracético a 60 e 30 mg/L.
- Contraste 6 (C6): comparar a eficiência entre as concentrações de 100 e 60 mg/L de CRT das soluções de cloramina orgânica.
- Contraste 7 (C7): comparar a eficiência entre as concentrações de 60 e 30 mg/L das soluções de ácido peracético.

Quadro 2 - Comparações de interesse entre sanificantes por cupom de prova

Comparações Sanificantes								
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆	S ₇	S ₈
(C1) S ₁ x S ₂ , S ₃ , S ₄ , S ₅ , S ₆ , S ₇ , S ₈	+7	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
(C2) S ₂ x S ₃ , S ₄ , S ₅ , S ₆ , S ₇ , S ₈	0	+6	-1	-1	-1	-1	-1	-1
(C3) S ₃ x S ₄	0	0	+1	-1	0	0	0	0
(C4) S ₃ , S ₄ x S ₅ , S ₆ , S ₇ , S ₈	0	0	+2	+2	-1	-1	-1	-1
(C5) S ₅ , S ₆ x S ₇ , S ₈	0	0	0	0	+1	+1	-1	-1
(C6) S ₅ x S ₆	0	0	0	0	+1	-1	0	0
(C7) S ₇ x S ₈	0	0	0	0	0	0	+1	-1

Em que

S₁ : água;

S₂ : hipoclorito de sódio, contendo 100 mg/L de CRT, pH 9,45;

S₃ : hipoclorito de sódio, contendo 100 mg/L de CRT, pH 8,0;

S₄ : hipoclorito de sódio, contendo 100 mg/L de CRT, pH 7,0;

S₅ : cloramina orgânica a 100 mg/L de CRT, pH 7,18;

S₆ : cloramina orgânica a 60 mg/L de CRT, pH 7,18;

S₇ : ácido peracético a 60 mg/L, pH 3,4; e

S₈ : ácido peracético a 30 mg/L, pH 3,7.

A adesão de esporos foi conduzida segundo um delineamento inteiramente casualizado, em 24 repetições, e analisada por meio de análise de variância, em nível de 5% de probabilidade.

Em relação à avaliação do procedimento da higienização dos cupons de prova pela técnica de ATP bioluminescência, os resultados foram analisados de maneira descritiva.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Adesão de esporos de *Bacillus sporothermodurans* em aço inoxidável

O Quadro 3 apresenta a adesão de esporos de *B. sporothermodurans*, expressa em porcentagem e em \log_{10} de UFC/cm², nos cupons de prova do sistema-modelo nas formas de cotovelo 90°, cilíndrica e em T, após 12 horas de incubação a 30°C. O Quadro 4 mostra o resumo da análise de variância do \log_{10} dos números desses esporos aderidos nesses cupons.

Observou-se que os esporos de *B. sporothermodurans* apresentaram capacidade de adesão aos cupons de prova, porém, não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre eles (Quadros 3 e 4). O \log_{10} do número de esporos aderidos por cm² para os cupons no formato de cotovelo 90°, cilíndrico e T foi, respectivamente, de 4,01, 3,88 e 4,03 (Quadro 3); seus valores correspondentes em porcentagem de adesão foram de 3,93 no cupom em formato de cotovelo 90°, 2,55 no cilíndrico e 4,46 no T.

Embora não tenham sido encontrados na literatura disponível trabalhos específicos que quantifiquem a adesão de *B. sporothermodurans* em superfícies, há indícios de que este microrganismo possua essa capacidade. Estudos realizados em fábricas da Europa, que apresentavam produtos contaminados com *B. sporothermodurans*, detectaram a presença deste microrganismo em quase todos os tipos de equipamentos UAT (HAMMER et al., 1995).

Quadro 3 - Porcentagem e \log_{10} do número de esporos de *B. sporothermodurans* (UFC/cm²) aderidos em aço inoxidável, AISI 304, após 12 horas de contato a 30°C. Média de 24 observações

Cupom	% de adesão	Log ₁₀ UFC/cm ²
Cotovelo 90°	3,93	4,01
Cilíndrico	2,55	3,88
T	4,46	4,03
Média Geral	3,65	3,97

Quadro 4 - Resumo da análise de variância do log₁₀ do número de esporos/cm² de *B. sporothermodurans* aderidos nos diferentes cupons de prova do modelo de linha de circulação de leite após 12 horas de incubação a 30° C

FV	GL	QM
Tratamentos	2	0,213 ^{ns}
Erro	69	0,098

ns - não-significativo a 5% de probabilidade ($P \geq 0,05$).

Além disso, há trabalhos que constataram a capacidade de outros esporos do gênero *Bacillus* de aderirem em superfícies inertes, como aço inoxidável, plástico, borracha, entre outros (SAGRIPANTI e BONIFACINO, 1999; REIS e ANDRADE., 1999; CABRAL e ANDRADE, 2000; OLIVEIRA et al., 1998; TE GIFFEL et al., 1995; BOWER et al., 1996).

CABRAL e ANDRADE (2000) pesquisaram a adesão de esporos de *Bacillus cereus* nos mesmos cupons de prova utilizados neste experimento. Obtiveram em média 22,08% de adesão, após contato com uma suspensão, em água destilada esterilizada, contendo cerca de 10⁶ esporos de *B. cereus*/mL durante 12 horas a 8°C.

Em outra pesquisa, cupons de prova de aço inoxidável de 0,4 cm² de área e tubos de borracha de silicone de 0,78 cm² foram expostos por 30 minutos a 0,05 mL de suspensão em caldo LB (Luria-Bertani), contendo cerca de 1,7 x 10⁹ esporos/ mL de *Bacillus subtilis* var. *globigii*. O número de esporos aderidos foi de 6,0 x 10⁶ por cupom de aço inoxidável e de 3,8 x 10⁶ por tubo de borracha de silicone (SAGRIPANTI e

BONIFACINO, 1999). Em relação ao cupom de aço inoxidável, a adesão do microrganismo foi de 17,65%.

Avaliando a adesão desse mesmo esporo em 1 cm² de superfície de polietileno, polipropileno e PVC, após 12 horas de contato com a suspensão em água destilada contendo 10⁶ esporos /mL a 25°C, verificou-se a adesão de cerca de 10⁵ esporos /cm², não apresentando diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre as superfícies (REIS e ANDRADE, 1999).

A adesão de *Bacillus subtilis*, *B. stearothermophilus* e *B. cereus* em cupons de vidro de 1 cm² foi pesquisada durante 12 horas de contato com as suspensões destes esporos a 32°C, contendo 10⁶ esporos/ mL (OLIVEIRA et al., 1998). Constataram-se as adesões máximas, expressas em log₁₀ de UFC/cm², de 4,7 em quatro horas, 4,5 em oito horas e 4,0 em duas horas para *B. subtilis*, *B. stearothermophilus* e *B. cereus*, respectivamente.

Em relação às células vegetativas, as informações obtidas na literatura sugerem dificuldades de comparação, devido às diferentes condições experimentais. Por exemplo, analisando a adesão de *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecium* em cupons de aço inoxidável em forma de T, cilíndrico e de cotovelo 90° de um modelo de circulação de leite, após 12 horas de contato a 18°C com a suspensão em leite integral esterilizado desses microrganismos contendo cerca de 10⁶ UFC/mL, detectou-se uma porcentagem de adesão de 5,83 e 2,21, respectivamente (FIGUEIREDO et al., 1999).

Em outra pesquisa, placas de aço inoxidável de 20 cm² foram incubadas a 45°C com leite inoculado com cerca de 1,0 x 10² UFC/mL de uma linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus*, durante seis horas, sob agitação. Após três horas de contato, as concentrações de células aderidas foram de 1,6 x 10¹ UFC/cm² e, em seis horas, de 1,9 x 10⁴ UFC/ cm², o que possivelmente aumentará com o aumento do tempo de contato (GÂNDARA e OLIVEIRA, 2000).

Em outro experimento, avaliou-se a adesão de *Listeria innocua* L6a e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 em cupons de prova de 1 cm² de aço inoxidável AISI 304, policarbonato e polipropileno. Esses cupons, devidamente limpos e esterilizados, foram imersos em uma suspensão de TSB (Tryptic Soy Broth) ou de BHI (Brain Heart Infusion), contendo 1,0 x 10³ UFC/mL de *L. innocua* ou de *S. aureus*, respectivamente, e incubados a 30°C. Constatou-se adesão máxima de 1,0 x 10⁵ UFC/mL após 10 horas de contato com a suspensão tanto para *L. innocua* quanto para *S. aureus*, independentemente da superfície estudada (PARIZZI, 1999).

O número de células aderidas de *B. sporothermodurans* neste estudo não constituiu um biofilme, já que, de acordo com ZOTTOLA (1997), para isso seria necessária uma adesão entre 10^6 e 10^7 UFC/ cm^2 . No entanto, nessas condições, a superfície encontra-se em situação inadequada para o uso, pois a APHA (American Public Health Association) sugere máximo de 2 UFC/ cm^2 para superfícies adequadamente higienizadas (VANDERZANT e SPLITTSTOESSER, 1992). Portanto, a presença desses esporos aderidos nas superfícies em quantidade superior à sugerida, pode implicar possível contaminação de alimentos.

4.2 Ação dos agentes químicos sanificantes sobre os esporos de *Bacillus sporothermodurans*

Há diferença significativa ($P < 0,05$) na eficiência dos sanificantes químicos sobre os esporos de *B. sporothermodurans* aderidos, porém, não se constatou influência dos tipos de cupom-T, cotovelo 90° e cilíndrico (Quadros 5 e 6).

Quadro 5 - Resumo da análise de variância do número de reduções decimais de *B. sporothermodurans* pela ação dos sanificantes, nos diferentes cupons de prova do modelo de linha de circulação de leite, após circulação a 1,5 m/s por 15 minutos, à temperatura ambiente (20-25°C)

FV	GL	QM
Sanificante	7	4,599*
Erro(a)	16	0,212
Cupom de prova	2	0,394 ^{ns}
Cupom de prova x sanificante	14	0,142 ^{ns}
Erro(b)	32	0,162

* significativo a 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

ns – não-significativo a 5% de probabilidade ($P \geq 0,05$).

Quadro 6 - Resumo do teste F para as comparações de interesse entre sanificantes

Comparação	GL	QM
(C1) S ₁ x S ₂ , S ₃ , S ₄ , S ₅ , S ₆ , S ₇ , S ₈	1	7,451*
(C2) S ₂ x S ₃ , S ₄ , S ₅ , S ₆ , S ₇ , S ₈	1	2,555*
(C3) S ₃ x S ₄	1	0,078 ^{ns}
(C4) S ₃ , S ₄ x S ₅ , S ₆ , S ₇ , S ₈	1	0,243 ^{ns}
(C5) S ₅ , S ₆ x S ₇ , S ₈	1	0,226 ^{ns}
(C6) S ₅ x S ₆	1	0,135 ^{ns}
(C7) S ₇ x S ₈	1	0,042 ^{ns}
Erro a	16	0,212

* significativo a 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

ns – não-significativo a 5% de probabilidade ($P \geq 0,05$).

S₁: água; S₂: hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 9,45; S₃: hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 8,0; S₄: hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 7,0; S₅: cloramina orgânica a 100 mg/L de CRT, pH 7,18; S₆: cloramina orgânica a 60 mg/L de CRT, pH 7,18; S₇: ácido peracético a 60 mg/L, pH 3,4; S₈: ácido peracético a 30 mg/L, pH 3,7.

A comparação entre a eficiência da água por ação mecânica e a dos diferentes sanificantes por ação química apresentou efeito significativo ($P < 0,05$) (Quadro 6). A remoção dos esporos, neste caso, ocorreu devido à força de atrito da água sobre a superfície dos cupons de prova, ou seja, apenas da ação mecânica gerada pelo escoamento do fluido pela superfície, que se classificou em turbulento, com o número de Reynolds estimado em 32000 ($\rho = 997 \text{ kg/m}^3$; $v = 1,5 \text{ m/s}$; $d = 0,01905 \text{ m}$; $\mu = 0,0009 \text{ kg/m.s}$).

A remoção dos microrganismos de tubulações é influenciada pela taxa de escoamento do fluido pela superfície. Sua transferência até a superfície da tubulação ocorre numa fina camada-limite. O aumento da turbulência do escoamento do fluido diminui a espessura dessa camada e isso resulta num aumento da sua taxa de transferência até a superfície (MCCABE et al., 1993; FOUST et al., 1982).

A Federação Internacional de Laticínios (FIL) estabelece a velocidade mínima de 1,5 m/s de circulação de soluções de limpeza e sanificantes para se obter uma higienização adequada (FLOH, 1993). Nesta velocidade, a turbulência do escoamento do fluido garante maior difusão das soluções pela superfície e magnitude de força de atrito, implicando a remoção de resíduos aderidos. Verifica-se também que ocorrem variações entre as diversas espécies bacterianas na resistência à remoção mecânica.

Neste experimento, verificou-se que a circulação da água a uma velocidade de 1,5 m/s por 15 minutos removeu em média 0,74 RD da população dos esporos de *B. sporothermodurans* aderidos nos cupons (Quadro 7), ou seja, $6,98 \times 10^3$ UFC/cm², que significam 74,79% de esporos retirados da superfície.

A influência do escoamento do fluido sobre a remoção de esporos de *B. cereus* aderidos em cupons de aço inoxidável, após 12 horas de contato com uma suspensão, em água destilada esterilizada, contendo cerca de 10^6 esporos/ mL, foi avaliada por CABRAL e ANDRADE (2000), no mesmo modelo de linha de circulação de leite utilizado neste experimento. Foi constatado que, ao aumentar a velocidade da água esterilizada de 0,5 m/s para 1,5 m/s, durante 10 minutos a 15°C, houve um aumento na remoção de 78,63 para 83,12% destes esporos da superfície. Neste mesmo trabalho, verificou-se que as resistências à ação mecânica do *B. sporothermodurans* e *B. cereus* dependeram das condições experimentais.

Quadro 7- Reduções decimais (RD) na população de esporos de *B. Sporothermodurans* devido à ação dos sanificantes circulados por 15 minutos a 1,5m/s, à temperatura ambiente (20-25°C), no modelo de linha de circulação de leite. Média de três repetições

Tratamentos	Cotovelo 90°	Cilíndrico	T	Média Geral
Água	0,83	0,50	0,88	0,74
Hipoclorito de sódio a 100mg/L CRT, pH 9,45	1,33	1,31	2,06	1,57
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L CRT, pH 8,0	2,26	2,82	2,77	2,62
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L CRT, pH 7,0	2,85	2,89	2,78	2,84
Cloramina orgânica a 100 mg/L CRT,	2,44	2,93	2,94	2,77

pH 7,18				
Cloramina orgânica a 60 mg/L CRT, pH 7,18	2,42	2,53	2,45	2,47
Ácido peracético a 60 mg/L, pH 3,4	2,49	2,40	2,39	2,43
Ácido peracético a 30 mg/L, pH 3,7	2,16	2,10	2,52	2,26

Em outro experimento realizado no mesmo equipamento citado, observou-se que, ao variar a velocidade de circulação do leite de 0,5 para 1,0 e 1,5 m/s, conseguia-se maior remoção de *P. aeruginosa* aderida nos cupons em forma de T, cotovelo 90° e cilíndrico, após 12 horas de incubação a 18°C, com uma suspensão do microrganismo inoculado em leite integral previamente esterilizado, contendo em torno de 10⁶ UFC/mL. Quando a velocidade de circulação do leite foi de 0,5 m/s, foram removidos 88,3%, e para as velocidades de 1,0 e 1,5 m/s esses valores foram de 94,6 e 95%, respectivamente (FIGUEIREDO e ANDRADE, 1999). A comparação entre a resistência à ação mecânica de *P. aeruginosa* e a de *B. sporothermodurans* é dificultada em razão da diferença no número inicial e do líquido de circulação.

Observou-se que apenas a ação mecânica da água não foi suficiente para obter uma higienização eficiente. Há, portanto, a necessidade de interação da ação mecânica com os fatores energia térmica, ação química e tempo de contato para se atingir tal objetivo.

A afirmação anterior foi constatada por GÂNDARA e OLIVEIRA (2000), quando avaliaram a eficiência das etapas da higienização e verificaram maior redução de uma linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* aderidos em placas de aço inoxidável de 20 cm², quando todas eram realizadas. Após seis horas de contato com a suspensão de *S. thermophilus*, contendo em torno de 10⁸ UFC/mL, encontravam-se aderidos 1,9 x 10⁴ UFC/cm². Em seguida, essas placas foram submetidas à limpeza alcalina, com produto comercial à base de NaOH na concentração de 1%, a 68-71°C durante sete minutos, e à limpeza ácida, com produto comercial à base de ácido fosfórico na concentração de 1%, à temperatura ambiente (20-25°C) por três minutos, sendo sanificadas com solução de hipoclorito de sódio a 100 mg/L de cloro residual total por três minutos de contato e temperatura ambiente (20-25°C). Não houve informação acerca do pH da solução clorada utilizada. A avaliação microbiológica não

detectou microrganismos por cm² na superfície analisada, sendo, portanto, o número de RD maior ou igual a 4,28.

Resultados semelhantes também foram observados por KRYSINSKI et al. (1992) na redução de *Listeria monocytogenes* quando foram associados os processos de limpeza e sanificação em poliéster e poliéster/poliuretano. O detergente alcalino clorado utilizado na concentração especificada pelo fabricante removeu a *L. monocytogenes* no poliéster. No entanto, para o poliéster/poliuretano foi necessária também a sanificação com hipoclorito de sódio a 200 mg/L, em pH 7,7, para se obter a mesma eficiência.

Quanto aos sanificantes químicos, verificou-se efeito significativo ($P < 0,05$) entre o hipoclorito de sódio, contendo 100 mg/L de cloro residual total (CRT) sem correção de pH (pH 9,45), e os demais sanificantes (Quadro 6). Ressalta-se, neste caso, que a ação química dos sanificantes foi influenciada pelo escoamento do fluido. Quando o escoamento é turbulento, a transferência do sanificante até a superfície é maior, resultando em remoção mais eficiente dos microrganismos aderidos.

As diferenças de eficiência obtidas entre as soluções de hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT em pH 9,45, 8,0 e 7,0 e as soluções da cloramina orgânica a 100 e 60 mg/L de CRT pode ser explicada pela concentração de ácido hipocloroso (HClO) presente nessas soluções, que é o agente antimicrobiano.

Reordenando os termos da equação de Henderson-Hasselbalch (equação 7), foi possível determinar a concentração de ácido hipocloroso nas soluções cloradas, da seguinte maneira:

$$\text{mg/L de HClO} = \frac{\text{mg/L de cloro residual livre}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pKa}}} \quad (7)$$

A solução de hipoclorito de sódio contendo 100 mg/L de CRT e pH 9,45 (sem correção de pH) apresentou menor concentração de ácido hipocloroso (Quadro 8), o que explica a pouca eficiência sobre os esporos aderidos nos cupons de prova. Com a correção do pH desta solução clorada para pH 8,0 e 7,0, obteve-se maior liberação de ácido hipocloroso. Assim, a diminuição do pH conduz a aumento na concentração de ácido hipocloroso e decréscimo de íon hipoclorito, implicando maior eficiência do sanificante (DYCHDALA, 1991; GIESE, 1991).

Quadro 8 - Efeito da concentração de ácido hipocloroso (HClO) das soluções sanificantes na ação esporicida sobre *B. sporothermodurans*

Sanificante	HClO (mg/L)	RD	D (min)
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L CRT, pH 9,45	1,68	1,57	9,55
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L CRT, pH 8,00	24,08	2,61	5,75
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L CRT, pH 7,00	75,59	2,84	5,28
Cloramina orgânica a 100 mg/L CRT, pH 7,18	67,63	2,77	5,41
Cloramina orgânica a 60 mg/L CRT, pH 7,18	40,43	2,47	6,07

Quando o pH da solução de hipoclorito de sódio, contendo 100 mg/L de CRT, foi corrigido com ácido nítrico de 9,45 para 8,0 e 7,0, as concentrações de ácido hipocloroso aumentaram de 1,68 mg/L para 24,08 e 75,59 mg/L, respectivamente, e os valores de D correspondentes a essa variação foram de 9,55 minutos para 5,75 e 5,28 minutos (Quadro 8).

Observa-se, portanto, que a diminuição do pH dessa solução melhora a eficiência deste, o que também foi constatado por ANDRADE e SERRANO (1993). Esses pesquisadores, utilizando uma solução de hipoclorito de sódio a uma concentração de 105 mg/L em pH 9,0, 8,0 e 7,0, a 30°C, em teste de suspensão, sobre esporos de *B. subtilis* ATCC 19659, obtiveram diminuição do valor de D pelo aumento da concentração de ácido hipocloroso. Essa solução, em pH 9,0, apresentou concentração de 3,22 mg/L de ácido hipocloroso, e, ao se diminuir o pH para pH 8,0 e 7,0 esta concentração aumentou para 25,24 mg/L e 79,55 mg/L. Os valores de D obtidos foram de 5,77, 0,94 e 0,25 minutos, respectivamente.

As informações anteriormente mencionadas levam a duas considerações: os esporos de *B. sporothermodurans* apresentam-se mais resistentes que os de *B. subtilis* ao ácido hipocloroso ou a maior resistência está associada ao fato de que os primeiros estavam aderidos à superfície de aço inoxidável, o que parece ser mais provável.

TE GIFFEL et al. (1995) encontraram variações nos resultados ao avaliarem a eficiência de compostos clorados em esporos de *B. cereus* em suspensão e aderidos, utilizando testes de suspensão e teste de superfície. No teste de suspensão, as soluções cloradas contendo 180 e 185 mg/L de cloro residual livre - o pH não foi informado -

apresentaram, após 10 minutos de contato a 50°C, efeito similares, obtendo-se 3,16 reduções decimais (RD). No teste de superfície, que se baseia na remoção de microrganismos aderidos em superfícies, onde foram avaliados aço inoxidável e borracha, observou-se maior resistência dos esporos nelas aderidos. Apenas 0,4 RD para a borracha e 0,7-0,8 RD para o aço inoxidável, devido à ação das duas soluções cloradas, foram alcançados no mesmo tempo de contato e temperatura.

Não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre as soluções de hipoclorito de sódio corrigidas para pH 8,0 e 7,0 e as soluções de cloramina orgânica 100 mg/L e 60 mg/L CRT (Quadro 6), apesar da diferença na concentração do ácido hipocloroso (Quadro 8).

A maior eficiência do clorado inorgânico foi verificada por BLOOMFIELD e ARTHUR (1989). Investigando a atividade de hipoclorito de sódio e dicloroisocianurato de sódio, ambos em pH 7,4, usando o teste de suspensão, sobre $3,0 \times 10^8$ esporos por mL de *B. subtilis*, esses autores constataram diferença na eficiência entre os sanificantes. Enquanto o hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT reduziu mais de 99,9% dos esporos em cinco minutos de contato, o dicloroisocianurato de sódio a 300 mg/L de CRT eliminou somente 30% destes esporos nas mesmas condições.

Por meio da equação que relaciona o \log_{10} dos valores de D em função da concentração de ácido hipocloroso (Figura 2), foi possível determinar o valor de Z (344,8 mg/L), que é a variação na concentração de HClO, em mg/L de cloro residual livre (CRL), necessária para reduzir em 90% o valor de D, em minutos. Assim, foi possível determinar a equação 11, que inter-relaciona o valor de D, em minutos, e a concentração de HClO:

$$D = D_r \times 10^{C_r \cdot C / 344,8} \quad (11)$$

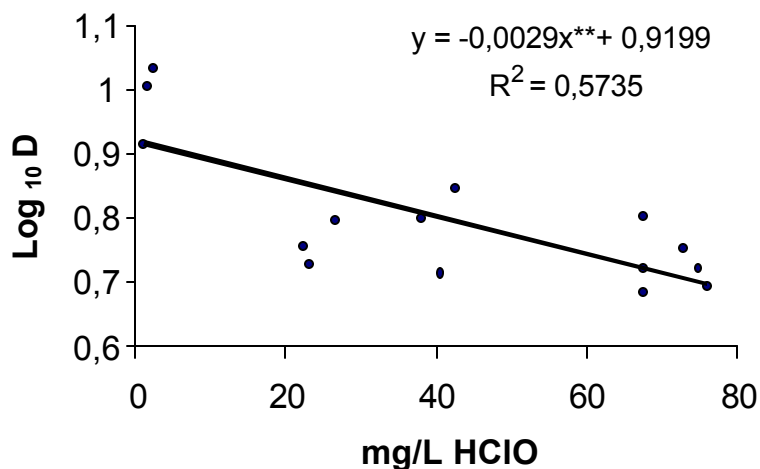
em que

D = valor de D, em minutos;

D_r = valor de D de referência, em minutos;

C_r = concentração de ácido hipocloroso de referência, em mg/L de CRL; e

C = concentração de ácido hipocloroso, em mg/L de CRL.



** Significativo a 1% de probabilidade ($P < 0,01$).

Figura 2 - Valor de D em função da concentração de ácido hipocloroso.

Considerando o valor de D_r como de 6,37 minutos e C_r igual a 40 mg/L tem-se a seguinte equação:

$$D = 6,37 \times 10^{40 - C / 344,8}$$

Esta equação é válida para as concentrações de ácido hipocloroso entre 1,68 e 75,59 mg/L (Quadro 8), que foi a faixa estudada. Assim, para obter 3 D a partir de uma concentração de 50 mg/L de HClO, expressa em CRL, o tempo de contato deverá ser de 17,76 minutos.

Observou-se que não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre as soluções de ácido peracético e as demais soluções, com exceção do hipoclorito de sódio a 100 mg/L, pH 9,45 (Quadros 6 e 7).

Pelos resultados obtidos, nenhum dos sanificantes atingiu 3 RD, que é o valor sugerido em testes de suspensão para a aprovação de sanificantes contra esporos nas condições de uso (TE GIFFEL et al., 1995). Não há um valor definido para aprovação de sanificantes agindo sobre microrganismos aderidos, sejam células vegetativas ou esporos. No entanto, assim como as células vegetativas aderidas, os esporos aderidos são mais resistentes à ação dos sanificantes, necessitando de concentrações e tempos de contato maiores para serem eficientes (MOSTELLER e BISHOP, 1993; TE GIFFEL et al., 1995).

TE GIFFEL et al., (1995) inocularam uma suspensão, contendo $1,0 \times 10^8$ de esporos de *B. cereus* por mL, mais 4% de leite, em discos de aço inoxidável e borracha de 20 mm de diâmetro e verificaram maior resistência desses esporos aderidos à ação das soluções cloradas, contendo 180 e 185 mg/L de CRT, após 10 minutos de contato a 50°C, ao compará-los em suspensão no mesmo tempo e na mesma temperatura de contato. Também foram constatadas diferenças na população de esporos para as duas superfícies avaliadas, em que se obteve 0,4 RD para a borracha e 0,7-0,8 RD para o aço inoxidável pela ação das duas soluções cloradas. Essa resistência pode estar relacionada com o meio envolvendo a bactéria e a natureza da superfície, as quais possuem fissuras e ranhuras que as protegem, devido à pouca penetração do sanificante.

Constata-se pelo Quadro 9 que, para se obter 3 RD, o tempo de contato dos sanificantes e dos esporos aderidos variou entre 15,83 e 28,71 minutos. Estes tempos de contato estão dentro de uma faixa adequada para o procedimento de higienização.

Quadro 9 - Valores de D para esporos de *B. sporothermodurans* em função de sanificantes circulados a 1,5 m/s por 15 minutos, à temperatura ambiente (20-25°C), no modelo de linha de circulação de leite

Sanificante	D* (min.)	3D** (min)
Água	20,36	61,09
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L CRT, pH 9,45	9,57	28,71
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L CRT, pH 8,0	5,74	17,21
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L CRT, pH 7,0	5,28	15,83
Cloramina orgânica a 100 mg/L CRT, pH 7,18	5,42	16,25
Cloramina orgânica a 60 mg/L CRT, pH 7,18	6,08	18,23
Ácido peracético a 60 mg/L, pH 3,4	6,18	18,53
Ácido peracético a 30 mg/L, pH 3,7	6,63	19,90

* Valores experimentais.

** Valores estimados.

A comparação dos resultados encontrados neste experimento com dados disponíveis na literatura torna-se dificultada em virtude das diferentes condições experimentais.

No entanto, de maneira geral, existe concordância entre as pesquisas de que o hipoclorito de sódio é igual ou mais eficiente sobre esporos do que o ácido peracético. Isto foi constatado por MORAES (1996), que avaliou a resistência de cinco isolados de esporos de bactérias aeróbias mesófilas de equipamentos de abatedouro de aves pelo teste de suspensão. As condições foram: tempo de contato de 30 minutos, com solução de hipoclorito de sódio, contendo 100 mg/L de CRT em pH 8,0, solução de cloramina orgânica dicloroisocianurato de sódio, contendo 150 mg/L de CRT em pH 8,4, e 300 mg/L de ácido peracético em pH 2,9. Verificou-se que o hipoclorito de sódio contendo 24 mg/L de HClO e o ácido peracético foram mais eficientes, ambos obtendo 2,2 RD na população de esporos mesófilos, e a cloramina orgânica, com 19 mg/L de HclO, obteve 0,8 RD.

Resultado semelhante foi obtido por TE GIFFEL et al. (1995), que, avaliando o efeito esporicida de duas concentrações de soluções de cloro e ácido peracético pelo teste de suspensão sobre esporos de *B. cereus* isoladas de indústrias de laticínios, verificaram diferença na eficiência desses sanificantes. As soluções cloradas contendo 180 e 185 mg/L de cloro residual livre apresentaram, após 10 minutos de contato a 50°C, efeitos similares, obtendo 3,16 reduções decimais (RD), e foram mais eficientes que as duas concentrações (140 e 200 mg/L) de ácido peracético, que conseguiram em média 1,15 e 1,9 RD, respectivamente.

Outra pesquisa mostrou o efeito esporicida de ácido peracético e hipoclorito de sódio sobre *B. subtilis* ATCC 6633 e um isolado selvagem obtido de membranas de ultrafiltração, *B. subtilis* 1, pelo teste de suspensão a 20°C, utilizando concentrações de 168 mg/L e 336 mg/L, respectivamente (ALASRI et al., 1993). Após duas horas de contato com a suspensão contendo $1,0 \times 10^5$ esporos/mL, os dois sanificantes apresentaram cinco reduções logarítmicas. Verificou-se inibição da adesão desses esporos na membrana, provocada pela ação dos dois sanificantes.

O efeito esporicida de ácido peracético a 400 mg/L em uma temperatura de 20°C foi avaliado em uma suspensão de esporos de *B. subtilis* SA22 (NCA 72-52), contendo $1,0 \times 10^6$ esporos/mL. Após 30 segundos de contato com essa solução, obteve-se um valor de D de 2,0 minutos, e, ao aumentar a temperatura para 30°C, esse valor diminuiu para 1,3 minuto (LEAPER, 1984). Os maiores valores de D correspondentes a 6,18 e 6,63 minutos, encontrados neste experimento (Quadro 9), podem ser explicados pelo fato de se usarem menores concentrações de ácido peracético (30 e 60 mg/L) e também porque, neste caso, os esporos estavam aderidos à superfície do aço inoxidável.

Os resultados deste experimento sugerem que o uso de hipoclorito de sódio, após correção do pH, pode ser escolhido sem prejuízo da eficiência do processo de higienização, além de apresentar menor custo (Quadro 10). Para corrigir o pH da solução de hipoclorito de sódio para pH 7,0 e 8,0, adicionaram-se 1,8 mL e 0,5 mL de ácido nítrico concentrado (70%) em 15 litros desta solução, respectivamente. O custo de ácido nítrico concentrado em dólar está em torno de US\$ 1,37 por litro.

Quadro 10 - Custo de aquisição de sanificantes disponíveis no mercado, em dólar

Sanificantes	Unidade	Custo unitário (US\$)
Hipoclorito de sódio comercial (ABC/Itaperuna, RJ)	L	0,20
Dicloro s. triazinatriona sódica diidratada (Sumaveg/ Lever Industrial)	Kg	4,70
Ácido peracético Vortexx	L	4,20

Com base no Quadro 10, pode-se estimar o custo de preparo das diversas soluções avaliadas no experimento. Por exemplo, para o preparo de 1.000 L de soluções de hipoclorito de sódio contendo 100 mg/L de CRT, gasta-se aproximadamente US\$ 0,23 quando o pH não é corrigido e US\$ 0,27 e US\$ 0,40 para valores de pH de 8,0 e 7,0, respectivamente. Para preparar o mesmo volume de soluções a partir da cloramina orgânica, os valores são de US\$ 15,66 para 100 mg/L de CRT e US\$ 9,40 para 60 mg/L de CRT. Para soluções contendo 30 e 60 mg/L de ácido peracético os valores são de US\$ 4,20 e US\$ 8,40, respectivamente. Portanto, verifica-se que, mesmo com a correção do pH da solução de hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, o seu custo é mais baixo em relação aos outros dois sanificantes. Assim, considerando-se que não houve diferença significativa ($P \geq 0,05$) entre os sanificantes, o hipoclorito de sódio pode ser utilizado, representando menor custo para as indústrias.

4.3. Avaliação do processo de higienização dos cupons de prova

Os resultados da avaliação das condições de higiene dos cupons de aço inoxidável, em URL, são mostrados em diferentes situações: a) após a etapa de pré-lavagem, lavagem alcalina, sanificação e, ainda, esterilização a 121°C durante 15 minutos dos cupons de prova (Quadro 11); b) após a adesão dos esporos de *B. sporothermodurans* ao final de 12 horas de incubação a 30°C com uma suspensão em tampão fosfato, contendo cerca de 10⁵ esporos/mL (Quadro 12); e c) após o procedimento de sanificação CIP do sistema-modelo, utilizando 60 mg/L de ácido peracético durante 15 minutos em temperatura ambiente (Quadro 13).

Quadro 11 - Avaliação dos cupons de prova pela técnica de ATP bioluminescência após a higienização CIP e esterilização a 121°C por 15 minutos. Valores expressos em Unidade Relativa de Luz (URL)

Repetição	Cotovelo 45°	Cilíndrico	T
1	32	32	34
2	26	28	20
3	39	40	39
Média	32	33	31

Quadro 12 - Avaliação dos cupons de prova pela técnica de ATP bioluminescência após a adesão de esporos de *B. sporothermodurans*, ao final de 12 horas de incubação a 30°C, com a suspensão contendo cerca de 10⁵ esporos/cm². Valores expressos em URL

Repetição	Cotovelo 45°	Cilíndrico	T
-----------	--------------	------------	---

1	54	67	76
2	69	146	161
Média	61	106	118

Quadro 13 - Avaliação dos cupons de prova pela técnica de ATP bioluminescência após a sanificação CIP, utilizando solução a 60 mg/L de ácido peracético por 15 minutos à temperatura ambiente (20-25° C), a uma velocidade de 1,5 m/s, e um pré-enxágüe por três minutos com água à temperatura ambiente (20-25° C). Valores expressos em URL

Repetição	Cotovelo 45°	Cilíndrico	T
1	113	50	88
2	87	50	133
Média	100	50	110

Os seis cupons avaliados após a sanificação e esterilização apresentaram resultados inferiores a 150 URL (Quadro 11), o que indica estarem limpos, livres de contaminação microbiana ou de resíduos orgânicos, com base na interpretação proposta pelo fabricante.

Após a adesão dos esporos, verificou-se, em média, valores abaixo de 150 URL para os diferentes tipos de cupons de prova (Quadro 12). No entanto, os resultados da enumeração dos esporos pela técnica da contagem-padrão em placas mostram valores em torno de $1,0 \times 10^4$ UFC/cm² (Quadro 3). Assim, pelo método tradicional de contagem microbiana, as superfícies dos cupons encontravam-se em condições higiênicas insatisfatórias, quando comparadas com a recomendação da APHA, que sugere o máximo de 2 UFC/cm² para superfícies adequadamente higienizadas.

Nesse caso, as informações obtidas pelos dois métodos são inconsistentes. A provável explicação para isso seria o fato de que os esporos bacterianos não apresentam metabolismo, níveis de ATP ou transporte de elétrons detectáveis, não tendo, portanto, energia suficiente para realizar a reação de formação de luz (BAKER et al., 1992). Assim, quando expostos ao complexo enzimático luciferina/luciferase, produziram menos bioluminescência, quando comparados com as células vegetativas. Uma outra possível

explicação, menos provável, mas que poderia contribuir para os resultados obtidos, seria o fato de a superfície não ser lisa, possuindo fissuras e ranhuras que podem “proteger” o esporo aderido da remoção com o swab.

Os resultados obtidos ao avaliar os cupons depois da circulação da solução a 60 mg/L de ácido peracético e pré-enxágüe com água à temperatura ambiente (20-25° C) por três minutos mostraram que todos os tipos de cupom encontravam-se limpos (Quadro 13).

Apesar do pequeno número de repetições e amostras analisadas no experimento, os resultados sugerem que a técnica de ATP bioluminescência não se mostra adequada para detectar a presença de esporos bacterianos.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

Este trabalho teve por objetivo avaliar a adesão de esporos de *B. sporothermodurans* em aço inoxidável, uma vez que há indícios de que este microrganismo possui a capacidade de se aderir nesta superfície. Além disso, analisou-se a eficiência de sanificantes nas concentrações utilizadas em indústrias de laticínios sobre esses esporos aderidos em cupons de aço inoxidável nas formas de cotovelo 90°, cilíndrico e T do modelo de linha de circulação de leite, simulando uma sanificação CIP (Cleaning In Place), ou seja, em condições de uso simulado.

Observou-se que os esporos de *B. sporothermodurans* possuem capacidade de se aderirem em aço inoxidável. Ao incubar os cupons de prova nos formatos de cotovelo 90°, cilíndrico e T por 12 horas a 30°C com uma suspensão, em tampão fosfato, contendo aproximadamente 10^5 esporos/mL, o \log_{10} do número de esporos que permaneceram aderidos por cm^2 foi, respectivamente, de 4,01, 3,88 e 4,03, e seus valores correspondentes em porcentagem de adesão foram de 3,93, 2,55 e 4,46%.

Ao avaliar a ação mecânica da água sobre a remoção dos esporos aderidos nos cupons de aço inoxidável, verificou-se que a circulação da água a uma velocidade de 1,5 m/s, tendo, portanto, um escoamento turbulento, durante 15 minutos, removeu em média 0,74 RD da população desses esporos aderidos, o que significa 74,79%.

Em relação aos sanificantes avaliados, não houve diferença ($P \geq 0,05$) entre os sanificantes, com exceção do hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, em pH 9,45, que apresentou a menor eficiência (1,57 RD), e também não se observou influência dos cupons de prova na eficiência dos sanificantes. Os números de reduções decimais obtidos, em ordem decrescente, foram de 2,84; 2,77; 2,67; 2,47; 2,43; e 2,26RD para as soluções de hipoclorito contendo 100 mg/L em pH 7,0; de cloramina orgânica, a 100 mg/L em pH 7,18; de hipoclorito contendo 100 mg/L em pH 8,0; de cloramina orgânica, a 60 mg/L em pH 7,18; de ácido peracético a 60 mg/L em pH 3,4; e de ácido peracético a 30 mg/L, em pH 3,7 respectivamente.

As diferenças na eficiência entre o hipoclorito de sódio contendo 100 mg/L de CRT sem correção de pH (pH 9,45) e as demais soluções cloradas inorgânicas com pH corrigidos pela adição de ácido nítrico concentrado (70%) e cloraminas orgânicas podem ser explicadas pela concentração de ácido hipocloroso (HClO) presente nessas soluções. Enquanto a solução de hipoclorito de sódio contendo 100 mg/L de CRT em pH 9,45 apresentava 1,68 mg/L de HClO, expresso em CRL, as soluções de hipoclorito de sódio corrigidas para pH 8,0 e 7,0 continham 24,08 e 75,59 mg/L, e as soluções cloraminas orgânicas, 100 e 60 mg/L de CRT, 67,63 e 40,43 mg/L de HClO. Foi observado maior valor de D com o aumento da concentração de HClO.

Determinou-se a equação a seguir, que inter-relaciona o valor de D, em minutos, e a concentração de HClO; nesta equação foi utilizado um valor de D de referência (D_r) de 6,37 minutos, que corresponde a uma concentração de referência (C_r) de HClO de 40 mg/L de CRL:

$$D = 6,37 \times 10^{40 - C/344,8}$$

em que

D = valor de D, em minutos; e

C = concentração de HClO, em mg/L de CRL.

Com esta equação, válida somente para valores dentro da faixa dos valores experimentais, que variam entre 9,55 e 5,28 minutos para os valores de D e entre 1,68 e 75,59 mg/L de HClO, pode-se calcular o valor de D ou a concentração de HClO que se enquadra nesta faixa.

Os resultados sugerem que o uso de soluções de hipoclorito de sódio com pH corrigido para 8,0 ou 7,0 pode ser escolhido sem prejuízo da eficiência do processo de higienização, além de apresentar menor custo.

Verificou-se, em condições de uso simulado, que somente a ação mecânica não é suficiente para a remoção de esporos de *B. sporothermodurans* aderidos em aço inoxidável, sendo necessário adotar sanificantes adequados, além de aplicar processos de higienização completa para garantir condições higiênicas satisfatórias, segundo recomendações da APHA (2 UFC/cm²).

No que se refere ao uso da técnica de ATP bioluminescência para avaliar o procedimento de higienização, puderam ser constatados alguns aspectos. Os resultados sugerem que a técnica não é adequada para detectar a presença de esporos bacterianos aderidos, devido provavelmente ao baixo nível de ATP detectável desses esporos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALASRI, A., VALVERDE, M., ROQUES, C. et al. Sporocidal properties of peracetic acid and hydrogen peroxide, alone and in combination, in comparison with chlorine and formaldehyde for ultrafiltration membrane disinfection. **Canadian Journal of Microbiology**, V.39, n.1, p. 52-60, 1993.
- ANDRADE, N.J., MACÊDO, J.A.B. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1996.182p.
- ANDRADE, N. J., SERRANO, A. M. Use of *Bacillus subtilis* spores to evaluate the efficiency of sodium hypochlorite at different concentration and pH values. **Revista de Microbiologia**, V.24, n.1, p. 26-31, 1993.
- ASSANTA, M. A.; ROY, D., MONTPETIT, D. Adhesion of *Aeromonas hydrophila* to water distribution system pipes after different contact times. **Journal Food Protection**, V.61, n.10, p. 1321-1329, 1998.
- BAKER, J. M., GRIFFITHS, M. W., COLLINS-THOMPSON, D. L. Bacterial bioluminescence: applications in food microbiology. **Journal Food Protection**, V.55, n.1, p. 62-70, 1992.
- BEER, D.; SRINIVASAM, R., STEWART, S. Direct measurement of chlorine penetration into biofilm during disinfection. **Applied Environmental Microbiology**, V.60, p. 4339-4344, 1994.

- BERUBE, R., OXBORROW, G. Methods of testing sanitizers and bacteriostatic substances. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 4th ed. Pennsylvania: Lea e Febiger, 1991. p 1058-1068.
- BIOTRACE. **BIOTRACE Xcel** [S. l.].2000. (Manual técnico, 140 p).
- BLOCK, S.S. Peroxygen compounds. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 4th ed. Pennsylvania: Lea e Febiger, 1991. p 167-181.
- BLOOMFIELD, S. F., ARTHUR, M. Effect of chlorine-releasing agents on *Bacillus subtilis* vegetative cells and spores. **Letters in Applied Microbiology**, V.8, p.101-104, 1989.
- BOWER, C. K., McGUIRE, J., DAESCHEL, M. A. The adhesion and detachment of bacteria and spores on food-contact surfaces. **Trends in Food Science Technology**, V.7, p. 152-157, 1996.
- BRASIL. Portaria nº 370, de 4 de setembro de 1997. Estabelece Regulamento técnico de identidade e qualidade do leite UHT (UAT). **Diário Oficial** (da República Federativa do Brasil), Brasília, 8 set. 1997.
- CABRAL, B. P.O., ANDRADE, N.J. Efeito do fluxo e do tempo de adesão de esporos de *Bacillus cereus* em superfície de aço inoxidável. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza. **Resumos...**, vol.1. Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000. p. 4.9.
- CRIADO, M. T.; SUAREZ, B., FERREROS, C. M. The importance of bacterial adhesion in dairy industry. **Food Technology**, V.48, p. 123-126, 1994.
- DYCHDALA, G. R. Chlorine and chlorine compounds. In: Block, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 4th. ed. Pennsylvania: Lea e Febiger, 1991. p 131-151.
- ECOLAB. **Vortexx**. [S. l.]:1999. (Informativo técnico).
- FELLOWS, P. **Tecnología del procesado de los alimentos: Principios y prácticas**. Trad. Francisco J. S. Trepal. Zaragoza: Acribia, 1994. 549p.
- FIGUEIREDO, H.M., ANDRADE, N.J. Efeito da velocidade de circulação do leite na capacidade de adesão de *Pseudomonas aeruginosa*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. p.383.
- FIGUEIREDO, H.M.; REIS, R.C., ANDRADE, N.J. Capacidade de adesão de diferentes microrganismos em sistema simulador de linha de processamento de leite. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 20, 1999, Salvador. **Anais...** Salvador: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1999. p.383.

- FLOH, R. Automatic recirculation cleaning in the 90's. **Dairy, Food and Environmental Sanitation**, V.13, n.4, p. 216-219, 1993.
- FOUST, A. S., WENZEL, L. A., CLUMP, C. W. et al. **Princípios das operações unitárias**. Trad. Horácio Macedo. 2. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Dois, 1982. 670p.
- GÂNDARA, A. L. N. e OLIVEIRA, J.S. Adesão de linhagem selvagem de *Streptococcus thermophilus* em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, V.20, n.1, p. 1-7, 2000.
- GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos**. São Paulo: Nobel, 1998. 284p.
- GIESE, J. Rapid microbiological testing kits and instruments. **Food Technology**, V.49, n.7, p. 64-71, 1995.
- GIESE, J. H. Sanitation: the key to food safety and public health. **Food Technology**, V.45, n.12, p. 74-80, 1991.
- GREEN, T. A., RUSSEL, S. M. e FLETCHER, D. L. Effect of chemical sanitizing agents on ATP bioluminescence measurements. **Journal Food Protection**, V.61, n.8, p. 1013-1017, 1998.
- GREENBERG, A.E.; CLESCERI, L.S.; EATON, A.D. ed. **Standard methods for the examination of Water and Waste-Water**. 18th. ed. Washington D.C.: American Public Health Association, 1992.
- GRIFFITHS, M. W. Applications of bioluminescence in the dairy industry. **Journal Dairy Science**. V.76, p. 3118-3125, 1993.
- HAMMER, P., LEMBKE, F., SUHREN, G. and HEESCHEN, W. Characterization of a heat resistant mesophilic *Bacillus* species affecting the quality of UHT-milk. **Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte**, V.47, n.4, p. 297-305, 1995.
- HAWRONSKYJ, J. M. e HOLAH, J. ATP: A universal hygiene monitor. **Trends in Food Science and Technology**. V. 8, p. 79-84, 1997.
- HERMAN, L., HEYNDRICKX and WAES, G. Typing of *Bacillus sporothermodurans* and other *Bacillus* species isolated from milk by repetitive element sequence based PCR. **Letters -in-Applied-Microbiology**, V.26, n.3, p. 183-188. 1998.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS-ICMSF. **Microorganisms in foods**. Their significance and methods of enumeration. Toronto: Acribia, 1978. v.1.
- KENNEDY Jr., J. E. e OBLINGER, J. L. Application of bioluminescence to rapid determination of microbial levels in ground beef. **Journal Food Protection**, V.48, n.4, p.334-340, 1985.

- KLIJN, N., HERMAN, L., LANGEVELD, L., VAEREWIJK, M., et al. Genotypical and phenotypical characterization of *Bacillus sporothermodurans* strains, surviving UHT sterilization. **International Dairy Journal**, V.7, n.(6-7), p. 421-428, 1997.
- KRAMER, J. F. Peracetic acid: A new biocide for industrial water applications. **Materials Performance**, V.36, n.8, p. 42-50, 1997.
- KRYSINSKI, E.P, BROWN, L. J. & MARCHISELLO, T. J. Effect of cleaners and sanitizers on *Listeria monocytogenes* attached to product contact surfaces. **Journal Food Protection**, V.55, n.4, p. 246-251, 1992.
- LEAPER, S. Influence of temperature on the synergistic sporicidal effect of peracetic acid plus hydrogen peroxide on *Bacillus subtilis* SA22 (NCA 72-52). **Food Microbiology**, V.1, p. 199-203, 1984.
- MARRIOTT, N. G. **Principles of food sanitation** 3rd ed. New York: Chapman & Hall, 1995. 421p.
- MCCABE, W. L., SMITH, J. C., HARRIOTT, P. **Unit operations of chemical engineering**. 5 ed. New York: McGraw-Hill, 1993. 1130p. (McGraw Hill chemical engineering series).
- MELLO, C. A., **Avaliação da eficiência de sanificantes químicos em condições de uso simulado sobre psicrotróficos acidificantes**. Viçosa, MG: UFV, 1997.63p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, 1997.
- MEYER, T. S. Uso do cloro na desinfecção da água, a formação de trihalometanos e os riscos potenciais à saúde pública. **Caderno Saúde Pública**, V.10, n.1, p. 99-110, 1994.
- MORAES, M.S.V. **Isolamento de esporos aeróbios mesófilos e termófilos em equipamentos de abatedouro de aves e avaliação de suas resistências a sanificantes químicos**. Viçosa, MG: UFV, 1996. 62p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)- Universidade Federal de Viçosa, 1996.
- MOSTELER, T.M. & BISHOP, J.R. Sanitizer efficacy against attached bacteria in milk biofilm. **Journal Food Protection**, V.56, n.1, p. 34-41, 1993.
- OLIVEIRA, A. D., AKUTSU, C. K. e ANDRADE, N. J. Adesão de esporos de *Bacillus* em vidro e polietileno avaliada por microscopia de contraste de fase e contagem em placas. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE MICROBIOLOGIA E HIGIENE DE ALIMENTOS, 5, 1998, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1998. p 140.
- PARIZZI, S. Q. F. **Adesão bacteriana em diferentes superfícies avaliada pela microscopia de epifluorescência e contagem em placas**. Viçosa, MG: UFV, 1999. 58p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 1999.

- PETTERSSON, B., LEMBKE, F., HAMMER, P., et al. *Bacillus sporothermodurans*, a new species producing highly heat-resistant endospores. **International Journal of Systematic Bacteriology**, 46:3, 759-764, 1996.
- REIS, R.C. & ANDRADE, N.J. Efeito do número inicial de esporos de *Bacillus cereus* e da temperatura na adesão em superfícies termoplásticas. In: **Anais do XX Congresso Brasileiro de Microbiologia**. Salvador- BA, 1999. AL-150, p.382.
- ROCHA, C. F., VILELA, M. A. P., PINTO, C. L. O. Aspectos de higiene e métodos de avaliação de procedimentos de limpeza e sanificação na indústria de laticínios. **Revista do ILCT**, V.309, n.54, p. 197-204, 1999.
- RUSSEL, A. D. Chemical sporicidal and sporostatic agents. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation** 4th. ed. Pennsylvania: Lea e Febiger, 1991.
- SAGRIPANTI, J. L. & BONIFACINO, A. Bacterial spores survive treatment with commercial sterilants and disinfectants. **Applied and Environmental Microbiology**, V.65, n.9, p. 4255-4260, 1999.
- SHARP, N. P. B. CIP system design and philosophy. **Journal Society Dairy Technology**, V.38, n.1, p. 17-21, 1985.
- TE GIFFEL, M. C., BEUMER, R. R., VAN DAM, W. F. et al. Sporicidal effect of disinfectants on *Bacillus cereus* isolated from the milk processing environment. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 421-430, 1995.
- TIMPERLEY, D. A. Modern cleaning and recovery system and techniques. **Journal Society Dairy Technology**, V.34, n.1, p. 06-14, 1981.
- TYDRICH, L. New applications for ATP bioluminescence methods. **Cereal Foods World**. V.41, n.6, p. 463-465, 1996.
- TROLLER, J. A. **Sanitation in food processing**. 2nd ed. San Diego: Academic Press, 1993. 478p.
- VANDERZANT, C., SPLITTSTOESSER, D. F. (Ed). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3rd ed. APHA. 1992. 1219p.
- VELAZQUEZ, M. e FEIRTAG, J. M. Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleansers, and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. **Journal Food Protection**.. V.60, n.7, p. 799-803, 1997.
- ZACARCHENCO, P.B., e LEITÃO, M.F.F. Avaliação e otimização da metodologia para contagem de *Bacillus sporothermodurans*. **Revista do ILCT**, V.309, n.54, p. 134-140, 1999.
- ZACARCHENCO, P.B., LEITÃO, M.F.F., DESTRO, M. T. et al. Ocorrência de *Bacillus sporothermodurans* em leite UAT/UHT brasileiro e a influência do tratamento térmico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, V.20, n.3, p. 363-368, 2000.

- ZOTTOLA, E.A. Microbial attachment and biofilms formation: a new problem for the food industry? **Food Technology**, V.48, n.7, p. 107-114, 1994.
- ZOTTOLA, E. A. e SASAHARA, K. C. Microbial biofilms in the food processing industry – Should they be a concern? **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 125-148, 1994.
- ZOTTOLA, E.A. Special techniques for studying microbial biofilms in food systems. In : TORTORELLO, M.L. & GENDEL, S.M. **Food microbiological analysis- New technologies-** IFT Basic Symposia, Marcell Dekker, p. 315-346, 1997.
- WICKRAMANAYAKE, G. B. & SPROUL, O.J. Kinetics of the inactivation of microorganisms. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 4th ed. Pennsylvania: Lea e Febiger, 1991. p 72-84.

APÊNDICE

APÊNDICE

Quadro 1A – Médias das duplicatas do número inicial de esporos de *B. sporothermodurans* aderidos e número de sobreviventes (nº final) após a sanificação, com respectivo número de reduções decimais (RD), no cupom de prova na forma de cotovelo 90°

Sanificantes	Repetição	nº inicial	nº final	RD
Água	1	$7,93 \times 10^3$	$1,54 \times 10^3$	0,71
	2	$2,65 \times 10^4$	$1,74 \times 10^3$	1,18
	3	$2,50 \times 10^4$	$6,31 \times 10^3$	0,60
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 9,45	1	$9,78 \times 10^3$	364×10^2	1,43
	2	$2,35 \times 10^4$	$1,33 \times 10^3$	1,25
	3	$2,18 \times 10^4$	$1,06 \times 10^3$	1,31
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 8,0	1	$2,50 \times 10^4$	$6,45 \times 10^1$	2,59
	2	$6,03 \times 10^3$	$3,22 \times 10^1$	2,27
	3	$6,31 \times 10^3$	$7,77 \times 10^1$	1,91
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 7,0	1	$1,90 \times 10^4$	$1,25 \times 10^2$	2,18
	2	$2,22 \times 10^4$	$1,71 \times 10^1$	3,11
	3	$2,12 \times 10^4$	$1,14 \times 10^1$	3,27
Cloramina orgânica a 100 mg/L de CRT, pH 7,18	1	$4,65 \times 10^3$	$7,58 \times 10^0$	2,79
	2	$3,74 \times 10^3$	$2,65 \times 10^1$	2,15
	3	$5,38 \times 10^3$	$2,28 \times 10^1$	2,37
Cloramina orgânica a 60 mg/L de CRT, pH 7,18	1	$7,93 \times 10^3$	$6,07 \times 10^1$	2,12
	2	$9,86 \times 10^3$	$2,09 \times 10^1$	2,67
	3	$2,45 \times 10^4$	$8,34 \times 10^1$	2,47
Ácido peracético a 60 mg/L, pH 3,4	1	$1,46 \times 10^4$	$2,84 \times 10^1$	2,71
	2	$4,97 \times 10^3$	$2,28 \times 10^1$	2,34
	3	$4,93 \times 10^3$	$1,9 \times 10^1$	2,41
Ácido peracético a 30 mg/L, pH 3,7	1	$5,80 \times 10^3$	$6,45 \times 10^1$	1,95
	2	$5,57 \times 10^3$	$4,93 \times 10^1$	2,05
	3	$4,10 \times 10^3$	$1,33 \times 10^1$	2,49

Quadro 2A – Médias das duplicatas do número inicial de esporos de *B. sporothermodurans* aderidos e números de sobreviventes (nº final) após a sanificação, com respectivo número de reduções decimais (RD), no cupom de prova cilíndrico

Sanificantes	Repetição	nº inicial	nº final	RD
Água	1	$7,22 \times 10^3$	$3,17 \times 10^3$	0,36
	2	$8,52 \times 10^3$	$2,02 \times 10^3$	0,63
	3	$9,69 \times 10^3$	$2,96 \times 10^3$	0,52
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 9,45	1	$8,05 \times 10^3$	$4,07 \times 10^2$	1,30
	2	$1,37 \times 10^4$	$4,86 \times 10^2$	1,45
	3	$7,52 \times 10^3$	475×10^2	1,20
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 8,0	1	$1,25 \times 10^4$	$2,26 \times 10^1$	2,74
	2	$5,71 \times 10^3$	$2,07 \times 10^1$	2,44
	3	$1,45 \times 10^4$	$7,54 \times 10^0$	3,28
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 7,0	1	$7,99 \times 10^3$	$1,13 \times 10^1$	2,85
	2	$6,52 \times 10^3$	$2,83 \times 10^1$	2,36
	3	$1,09 \times 10^4$	$3,77 \times 10^0$	3,46
Cloramina orgânica a 100 mg/L de CRT, pH 7,18	1	$1,17 \times 10^4$	$7,54 \times 10^0$	3,19
	2	$3,73 \times 10^3$	$1,88 \times 10^0$	3,30
	3	$6,68 \times 10^3$	$3,39 \times 10^1$	2,29
Cloramina orgânica a 60 mg/L de CRT, pH 7,18	1	$3,22 \times 10^3$	$4,71 \times 10^1$	1,83
	2	$1,05 \times 10^4$	$1,32 \times 10^1$	2,90
	3	$9,69 \times 10^3$	$13,2 \times 10^1$	2,87
Ácido peracético a 60 mg/L, pH 3,4	1	$1,20 \times 10^4$	$4,90 \times 10^1$	2,39
	2	$5,66 \times 10^3$	$3,20 \times 10^1$	2,25
	3	$6,27 \times 10^3$	$1,70 \times 10^1$	2,57
Ácido peracético a 30 mg/L, pH 3,7	1	$3,68 \times 10^3$	$3,77 \times 10^1$	1,99
	2	$6,01 \times 10^3$	$3,96 \times 10^1$	2,18
	3	$4,63 \times 10^3$	$3,39 \times 10^1$	2,13

Quadro 3A – Médias das duplicatas do número inicial de esporos de *B. sporothermodurans* aderidos e números de sobreviventes (nº final) após a sanificação, com respectivo número de reduções decimais (RD), no cupom de prova T

Sanificantes	Repetição	nº inicial	nº final	RD
Água	1	$3,26 \times 10^3$	$2,15 \times 10^3$	0,18
	2	$2,18 \times 10^4$	$1,20 \times 10^3$	1,26
	3	$3,66 \times 10^4$	$2,30 \times 10^3$	1,20
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 9,45	1	$5,86 \times 10^4$	$1,05 \times 10^2$	2,75
	2	$2,68 \times 10^4$	$4,53 \times 10^2$	1,77
	3	$1,37 \times 10^4$	$3,04 \times 10^2$	1,65
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 8,0	1	$1,31 \times 10^4$	$3,52 \times 10^1$	2,57
	2	$7,57 \times 10^3$	$2,41 \times 10^1$	2,50
	3	$1,57 \times 10^4$	$9,25 \times 10^0$	3,23
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 7,0	1	$4,55 \times 10^4$	$1,48 \times 10^1$	3,49
	2	$2,44 \times 10^4$	$7,77 \times 10^1$	2,50
	3	$1,91 \times 10^4$	$8,33 \times 10^1$	2,36
Cloramina orgânica a 100 mg/L de CRT, pH 7,18	1	$1,48 \times 10^4$	$7,40 \times 10^0$	3,30
	2	$2,22 \times 10^3$	$1,85 \times 10^0$	3,08
	3	$3,15 \times 10^3$	$1,11 \times 10^1$	2,45
Cloramina orgânica a 60 mg/L de CRT, pH 7,18	1	$5,76 \times 10^3$	$2,04 \times 10^1$	2,45
	2	$7,35 \times 10^3$	$5,55 \times 10^0$	3,12
	3	$1,13 \times 10^4$	$1,83 \times 10^2$	1,79
Ácido peracético a 60 mg/L, pH 3,4	1	$3,57 \times 10^3$	$3,7 \times 10^1$	1,98
	2	$1,09 \times 10^4$	$2,04 \times 10^1$	2,73
	3	$6,03 \times 10^3$	$2,04 \times 10^1$	2,47
Ácido peracético a 30 mg/L, pH 3,7	1	$6,24 \times 10^3$	$3,52 \times 10^1$	2,25
	2	$5,20 \times 10^3$	$2,22 \times 10^1$	2,37
	3	$6,39 \times 10^3$	$7,40 \times 10^0$	2,94

Quadro 4A - Porcentagem de adesão inicial de esporos de *B. sporothermodurans* e final após a sanificação, no cupom de prova na forma de cotovelo 90°

Sanificantes	Repetição	% inicial	% final	Média I	Média F
Água	1	3,65	19,38	6,01	17,06
	2	5,82	6,57		
	3	8,56	25,23		
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 9,45	1	2,96	3,72	6,74	4,74
	2	5,83	5,64		
	3	11,41	4,87		
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 8,0	1	6,16	0,26	2,83	0,67
	2	1,03	0,53		
	3	1,30	1,23		
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 7,0	1	2,95	0,66	4,84	0,26
	2	8,22	0,08		
	3	3,33	0,05		
Cloramina orgânica a 100 mg/L de CRT, pH 7,18	1	2,36	0,16	2,28	0,43
	2	2,56	0,71		
	3	1,91	0,42		
Cloramina orgânica a 60 mg/L de CRT, pH 7,18	1	2,64	0,77	4,71	0,44
	2	3,32	0,21		
	3	8,17	0,34		
Ácido peracético a 60 mg/L, pH 3,4	1	5,20	0,19	2,78	0,34
	2	1,93	0,46		
	3	1,22	0,38		
Ácido peracético a 30 mg/L, pH 3,7	1	1,09	1,11	1,30	0,77
	2	1,61	0,88		
	3	1,20	0,32		

Quadro 5A - Porcentagem de adesão inicial de esporos de *B. sporothermodurans* e final após a sanificação, no cupom de prova cilíndrico

Sanificantes	Repetição	% inicial	% final	Média I	Média F
Água	1	3,33	43,86	2,84	32,68
	2	1,87	23,66		
	3	3,32	30,53		
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 9,45	1	2,44	5,05	3,26	4,97
	2	3,40	3,55		
	3	3,94	6,32		
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 8,0	1	3,08	0,18	2,34	0,20
	2	0,97	0,36		
	3	2,98	0,05		
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 7,0	1	1,24	0,14	1,79	0,20
	2	2,41	0,43		
	3	1,71	0,03		
Cloramina orgânica a 100 mg/L de CRT, pH 7,18	1	5,94	0,06	3,62	0,21
	2	2,55	0,05		
	3	2,37	0,51		
Cloramina orgânica a 60 mg/L de CRT, pH 7,18	1	1,07	1,46	2,61	0,58
	2	3,54	0,13		
	3	3,23	0,14		
Ácido peracético a 60 mg/L, pH 3,4	1	4,27	0,41	2,67	0,42
	2	2,20	0,57		
	3	1,55	0,27		
Ácido peracético a 30 mg/L, pH 3,7	1	0,69	1,03	1,26	0,81
	2	1,73	0,66		
	3	1,36	0,73		

Quadro 6A - Porcentagem de adesão inicial de esporos de *B. sporothermodurans* e final após a sanificação, no cupom de prova T

Sanificantes	Repetição	% inicial	% final	Média I	Média F
Água	1	1,50	65,91	6,28	25,89
	2	4,79	5,51		
	3	12,53	6,26		
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 9,45	1	17,76	0,18	10,53	1,36
	2	6,65	1,69		
	3	7,17	2,22		
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 8,0	1	3,23	0,27	2,58	0,22
	2	1,29	0,32		
	3	3,22	0,06		
Hipoclorito de sódio a 100 mg/L de CRT, pH 7,0	1	7,07	0,03	6,37	0,26
	2	9,04	0,32		
	3	3,00	0,44		
Cloramina orgânica a 100 mg/L de CRT, pH 7,18	1	7,51	0,05	3,38	0,16
	2	1,52	0,08		
	3	1,12	0,35		
Cloramina orgânica a 60 mg/L de CRT, pH 7,18	1	1,92	0,35	2,72	0,68
	2	2,47	0,08		
	3	3,77	1,62		
Ácido peracético a 60 mg/L, pH 3,4	1	1,27	1,04	2,33	0,52
	2	4,24	0,19		
	3	1,49	0,34		
Ácido peracético a 30 mg/L, pH 3,7	1	1,17	0,56	1,52	0,37
	2	1,50	0,43		
	3	1,87	0,12		

Quadro 7A - Resumo da análise de variância da regressão linear do valor de D em função da concentração de HCIO

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,757298
	847
R-quadrado	0,573501
	544
R-quadrado ajustado	0,540693
	97
Erro-padrão	0,073419
	809
Observações	15

ANOVA

FV	GL	SQ	MQ	F	F de significação
Regressão	1	0,09422952	0,09422952	17,48076682	0,001077045
Resíduo	13	0,070076089	0,005390468		
Total	14	0,164305609			

