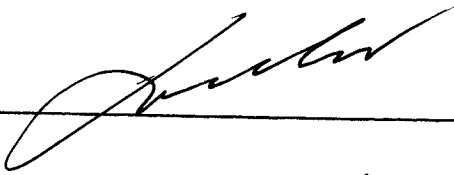


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

PARECER

Este exemplar corresponde a edição
final da tese defendida por Jair
Vicente de Oliveira e aprovada
pela Comissão Julgadora em 08.04.85.
Campinas, 08 de abril de 1985.



Presidente da Banca

RESISTÊNCIA DE Salmonella typhi E Clostridium
perfringens AO USO CONTÍNUO DE HIPOCLORITO DE
SÓDIO E DE UM COMPOSTO DE AMÔNIO QUATERNÁRIO.

JAIR VICENTE DE OLIVEIRA

Médico Veterinário

05/85

ORIENTADOR:

Prof. Dr. ANTÔNIO DE MELO SERRANO

Tese apresentada a Faculdade de Engenharia de Alimentos e
Agrícola da Universidade Estadual de Campinas para obten-
ção do Grau de Mestre em Ciência de Alimentos.

Campinas, S.P., 1985.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde e à Universidade Estadual de Campinas por tornarem possível a realização deste Curso de Mestrado;

Ao professor Antônio de Melo Serrano pela amizade e conhecimentos transmitidos;

Aos amigos Benedito Dutra Pimenta, Maria Eliza Trouy Gales e Eliezer José Marques pelo apoio constante, que tornou possível a minha participação neste curso;

À Associação Brasileira de Indústrias da Alimentação (ABIA), que deu o suporte financeiro para as cópias "xerográficas" desta tese;

Aos amigos Paulo, Lucio e Fernando pela amizade e cooperação;

Ao Prof. Frederic C. Strong III, pela correção do resumo em inglês do trabalho;

Às indústrias HENKEL DO BRASIL S/A, e à DIVERSEY S/A pelo fornecimento dos sanificantes para a execução deste trabalho;

A todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Ciência de Alimentos e Departamento de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP;

Àqueles que, diretamente ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho,

Muito obrigado.

Aos meus pais pelo carinho e
apoio, à minha esposa, com pro
funda admiração, pela compree
são e
Aos meus filhos.

ÍNDICE

	Página
Resumo em português	1
Summary	3
1 Introdução	5
2 Revisão Bibliográfica	7
2.1 Uso dos compostos clorados	7
2.1.1 Modo de ação	7
2.1.2 Dosagem	12
2.1.3 Uso do cloro em alimentos e superfícies...	14
2.2 Uso dos compostos de amônio quaternário	18
2.2.1 Modo de ação	19
2.2.2 Dosagem	20
2.2.3 Inativação do sanificante	23
2.3 Injúria de células microbianas	26
3 Materiais e Métodos	31
3.1 Materiais	31
3.1.1 Culturas	31
3.1.2 Sanificantes	31
3.1.3 Equipamentos de laboratório	31
3.1.4 Meios de cultura e reagentes	33

3.2	Métodos	33
3.2.1	Exposição das culturas ao sanificante em tubo de ensaio	33
3.2.2	Exposição das culturas ao sanificante em superfície de aço inoxidável	36
3.2.3	Coeficiente fenólico	41
3.2.4	Dosagem do cloro ativo	41
3.2.5	Exame microscópico	41
4	Resultados	43
4.1	Contagens dos microrganismos	43
4.1.1	<u>Clostridium perfringens</u>	43
4.1.2	<u>Salmonella typhi</u>	46
4.2	Coeficiente fenólico	49
4.2.1	<u>Clostridium perfringens</u>	49
4.2.2	<u>Salmonella typhi</u>	49
4.3	Exame microscópico	63
4.3.1	<u>Clostridium perfringens</u>	63
4.3.2	<u>Salmonella typhi</u>	64
5	Discussão	70
5.1	Ação do hipoclorito em tubos	70
5.2	Ação do CAQ em tubos	71
5.3	Ação do hipoclorito em superfície	72
5.4	Ação do CAQ em superfície	72

6	Conclusões	73
7	Referências Bibliográficas	74

R E S U M O

Foram utilizadas culturas de Clostridium perfringens e Salmonella typhi ambas submetidas a aplicações repetidas de hipoclorito de sódio, solução com 9,5% de cloro ativo na diluição 1/500 e ao composto de amônio quaternário (CAQ), cloreto de laurildimetilbenzil - amônio a 50%, na diluição 1/2000.

Uma parte do experimento foi realizada de forma típica de laboratório, utilizando tubos de ensaio, onde se usava 3 ml da cultura e juntava-se 3 ml de CAQ, deixava-se atuar o sanificante por 1 minuto e 30 segundos, transferindo-se depois 1 ml da mistura sanificante e cultura para o meio de tioglicolato, as cepas de Clostridium perfringens, e para o caldo nutriente, a Salmonella typhi. Repetia-se esta operação até ao 5º dia, ao 6º dia neutralizava-se o CAQ com solução de tween 80 a 6% mais solução de lecitina a 4%. Após a neutralização, este conjunto diluia-se em série e plaqueava-se, o Clostridium perfringens em ágar de Shahidi Ferguson Perfringens (SFP) e a Salmonella typhi em ágar, para contagem em placa (ACP). Ao 7º dia, após a contagem, retirava-se uma colônia e transferia-se para os tubos contendo meio de enriquecimento apropriado para cada microrganismo (caldo nutriente e tioglicolato). O mesmo

procedimento foi feito com o hipoclorito de sódio, variando a atuação, que foi de 2 minutos e o neutralizante que foi a solução de tiosulfato de sódio a 5%.

Na outra parte do experimento foi usada superfície de aço inoxidável estéril, na qual se espalhava 5 ml de caldo de carne e mais 1 ml da cultura e em seguida adicionava-se 5 ml do sanificante e agitava-se o conjunto. O tempo de atuação foi o mesmo utilizado para a metodologia dos tubos. Após a atuação, com uma zaragatoa, coletava-se amostra de 15 cm² em três diferentes locais da superfície e em seguida transferia-se a zaragatoa para os tubos contendo meio de enriquecimento já descrito.

As células de Clostridium perfringens e Salmonella typhi apresentaram resistência ao hipoclorito de sódio quando usados tubos, enquanto que nos outros casos, as cepas, tanto de Clostridium perfringens como de Salmonella typhi, foram destruídas.

SUMARY

Cultures of C. perfringens and S. typhi were both submitted to repeated applications of sodium hypochlorite 9,5 % solution of active chlorine diluted (1:500) and 5% quaternary ammonium compound (Q.A.C.), laurydimethylbenzilammonium chloride diluted 1/2000.

One part of the experiment was performed in a typical laboratory test tube procedure by mixing 3 mL of Q.A.C. with 3 mL of culture and letting it act for a period of 1'30". Then 1 mL of this mixture, sanitizing compound plus C. perfringens Culture was transferred to a thioglycolate medium, and 1 mL of the other mixture (sanitizing compound plus S. typhi) was transferred to nutrient broth. This procedure was repeated until the 5th day; on the 6th day, the Q.A.C. was neutralized with a solution consisting of 6% Tween 80 and 4% lecithin. After the neutralization, the solutions were diluted in a serial range. The C. perfringens was transferred to an agar plate (Shaihd Ferfunson Perfringens-SFP) and the S. typhi to a Plate Count Agar (PCA). On the 7th day, after counting, the colony was withdrawn and transferred to tubes with the appropriate medium (thioglycolate or nutrient broth). The same procedure was followed with the sodium hypochlorite, changing the time to two minutes and the neutralizing agent to 5% sodium thiosulphate.

In the other part of the experiment, 5 mL of meat broth, 1 mL of culture and 5 mL of sanitizing compound were placed on sterilized stainless steel surface and shaken. The time period used were the same as those in the test tube method. After reaction, samples from the different places on the surface were collected with swabs and transferred to tubes with the medium described above.

The cells of C. perfringens and S. typhi were resistant to treatment with sodium hypochlorite in test tubes, while in the other cases the strains C. perfringens and S. typhi were killed.

1 INTRODUÇÃO

Na literatura brasileira e mesmo na de outros países não foi encontrado qualquer trabalho referente a resistência de microrganismos em decorrência do uso contínuo de um sanificante qualquer.

O que se observa na literatura é a existência de alguns trabalhos que testam a eficiência dos sanificantes frente aos microrganismos, quando o sanificante é aplicado até o 14º dia.

As operações fundamentais de higienização e controle sanitário das indústrias de alimentos e casas comerciais ou qualquer lugar onde se manipulam alimentos, às vezes, são efetuadas em condições inadequadas, com concentrações incorretas dos agentes químicos. Por isso, resolvemos verificar se o uso contínuo de sanificantes para higienização da indústria de alimentos, quando se utilizam concentrações sub-letais, pode provocar resistência das células bacterianas. Se essa resistência houvesse, acreditávamos que na prática de aplicação em locais de produtos alimentícios, onde se podem usar, por economia ou por ignorância, concentrações mais baixas que as recomendadas, também pudesse ocorrer o fenômeno da resistência com graves prejuízos higiênico-econômicos.

Para desenvolver a experiência, escolhemos dois microrganismos, Salmonella typhi e Clostridium perfringens, um gram negativo e aeróbio e o outro gram positivo e anaeróbio, encontrados frequentemente em alimentos.

Utilizamos dois sanificantes de uso comum na indústria de alimentos, um composto de cloro e outro, um composto de amônio quaternário. Esses sanificantes foram avaliados em seu poder germicida durante 3 meses de forma a obtermos dosagens sub-letais e que permitissem a recuperação de células vivas.

Escolhemos dois métodos de aplicação dos sanificantes: um na forma típica de laboratório, usando tubos de ensaio, e outro, em condições similares às da indústria de alimentos, utilizando superfície de aço inoxidável, como se fosse superfície de equipamento ou utensílio. Por falta de trabalhos anteriores em que nos pudessemos apoiar, usamos estes diferentes métodos, na esperança de que um pelo menos, fosse o conveniente.

Esperávamos que se viéssemos a provar que a resistência poderia ocorrer, outras pesquisas posteriores deveriam completar o conhecimento.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Compostos Clorados

2.1.1 Modo de ação

Entre os halogênios, o cloro e seus compostos são os mais comumente usados (31,55). Tem sido estudados os seus efeitos e as suas variações que dependem de diferentes fatores, tais como a população de células, o pH, a concentração do sanificante, o tempo de contato com as bactérias, a temperatura, a matéria orgânica presente no meio, a espécie e forma do microrganismo (53).

Os compostos de cloro têm sido usados por muitos anos na sanificação de utensílios de restaurantes e indústrias de alimentos, na sanificação de equipamentos e várias superfícies, na redução da flora microbiana de carnes de frango (43), pedaços de carne (3,4,45), alimentos marinhos (29) e verduras (41,63), no tratamento de águas para bebidas ou para uso industrial, etc.

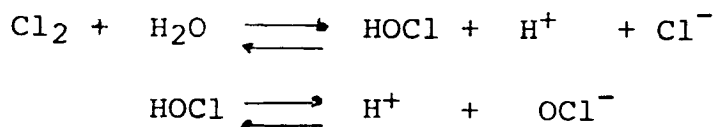
Quando o cloro é adicionado à água, uma pequena quantidade, reage com as impurezas nela contidas. O cloro também perde sua atividade, na presença de luz e calor. Esse cloro

consumido não tem propriedades germicidas, constituindo a demanda do cloro (31,56).

AZEVEDO NETTO (8) considera que ao se examinar o efeito bactericida da cloração, é essencial conhecer os compostos produzidos na água, os quais dependem da natureza das impurezas presentes e do pH da água.

Desse modo, dois casos extremos poder ser considerados: reações do cloro com a água, com a formação do cloro residual livre e reação do cloro com a amônia formando o cloro residual combinado.

O cloro (Cl_2), quando adicionado a água, hidroliza-se formando ácido hipocloroso (HOCl). O ácido hipocloroso formado dissocia-se em cátions de hidrogênio (H^+) e ânions hipoclorito (OCl^-). (8,30,52,56), da seguinte forma



A proporção relativa do ácido hipocloroso para ions hipoclorito depende do pH, temperatura e força iônica (53).

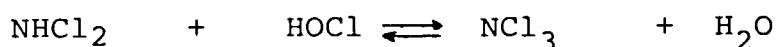
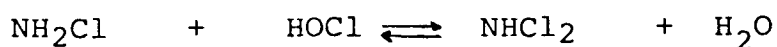
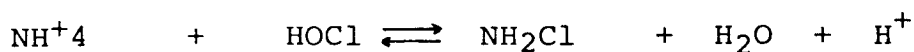
Os compostos clorados são mais efetivos em pH baixo, quando então a presença de ácido hipocloroso é dominante. Quando o pH é elevado, o ion hipoclorito é dominante e a solu

ção têm menor efeito antimicrobiano (31).

SHANON et alii (67) usando como constante a concentração do cloro e o tempo de ação do sanificante sobre uma mesma cepa de microrganismo, tendo como variável o pH, concluíram que o hipoclorito de sódio era mais efetivo em pH 5,8 que em pH 8,4.

O cloro existente na água na forma de ácido hipocloroso e de ion hipoclorito é definido como cloro residual livre (62).

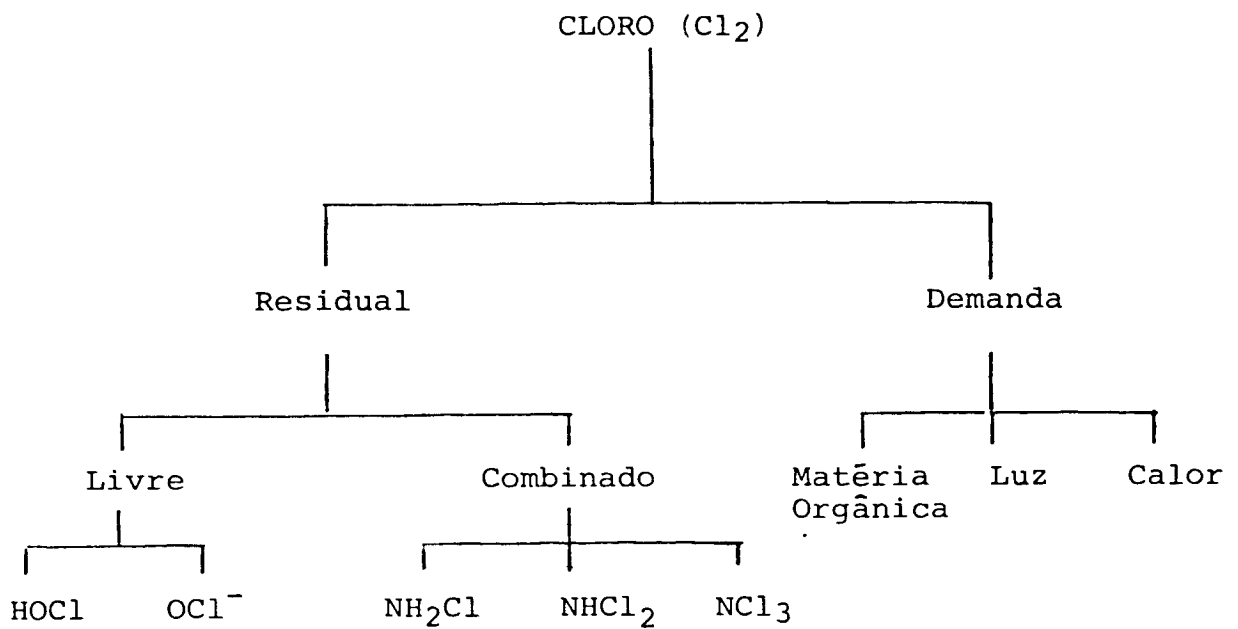
Quando o cloro é aplicado às águas com presença de matéria orgânica, amônia e/ou compostos amoníacais, forma compostos clorados, denominados cloraminas. O cloro, sob a forma de ácido hipocloroso, combinando-se com amônia presente na água, forma monocloramina (NH_2Cl), dicloramina (NHCl_2) e tricloreto de nitrogênio (NCl_3), de acôrdo com as seguintes reações:



A dicloramina (NHCl_2) é de maior efeito bactericida.

O cloro se combina também com outros composto ni trogenados, formando derivados mono e diclorados que se denominam derivados monocloraminos e derivados dicloraminos, quando o nitrogenio pertence a um radical amino (8).

Em resumo, o cloro quando adicionado a água, não sô forma compostos bactericidas, mas também se consome, conforme o esquema (8):



Como foi dito anteriormente, os compostos de maior interesse na desinfecção das águas são o ácido hipocloroso e a dicloramina.

Mas segundo MOOD (47), o cloro residual livre é um bactericida mais efetivo do que o cloro residual combinado, no tratamento de águas.

Quanto a inativação das células microbianas, alguns autores inicialmente pensaram na formação de um composto tóxico N-cloro, responsável pela inibição da oxidação da glicose ou ainda da inibição da oxidação do grupamento sulfidril (54).

FREIBERG (25), usando cloro radioativo, observou que ao primeiro contato, a reação de oxidação com o microbio resultava na formação de cloramina no protoplasma celular, não causando destruição inicial da bactéria. Ainda o mesmo autor, num outro trabalho, usando fósforo marcado radioativamente concluiu que o microrganismo na presença de cloro sofre uma destruição da membrana celular e como consequência alterava-se a permeabilidade da célula (26).

Em trabalho mais recente, CAMPER & FETERS (14), relataram que o cloro prejudica a função da membrana celular, no transporte extracelular de nutrientes, e que as células tratadas com cloro são incapazes de utilizar carboidratos e aminoácidos.

BERNARD et alii (9), usando dióxido de cloro e marcando o carbono do aminoácido com radiotividade, notaram que, para cepas de E. coli, o cloro bloqueia a síntese de proteínas.

Dos trabalhos realizados com microrganismos espo

culados WYATT & WAITES (85), relataram que os compostos clorados estimulam a germinação de esporos, e em seguida os inativa. KULIKOVSKY et alii (39), verificaram que o cloro altera a permeabilidade do esporo através de alteração no tegumento, resultando na liberação da Ca^{++} , ácido dipiconílico, ácido ribonucleico (RNA) e ácido desoxiribonucleico (DNA).

O hipoclorito de sódio é enérgico agente oxidante, inativador de proteínas, tendo estas características como propriedade fundamental, sendo por isso letal para todos os microrganismos (56).

2.1.2 Dosagem

É de inegável importância, no contexto do nosso trabalho, mencionarmos alguns dos poucos relatos existentes referentes a sensibilidade e resistência dos microrganismos aos compostos clorados, em especial ao hipoclorito de sódio.

Hipoclorito de sódio numa solução com 10 ppm de cloro livre provocou a destruição de 99,9% das células de E. coli no tempo de 15 segundos (20).

Por outro lado NIELSEN (52), notou inativação completa de fagos de E. coli e Streptococcus por hipoclorito de sódio com 50 ppm de cloro ativo no tempo de 5 minutos.

O cloro na concentração de 12,5 ppm. foi mais efetivo contra Salmonella derby no pH 5,6 do que no pH 7,2 (48).

Os resultados obtidos por SHANON et alii (68), mostraram que o cloro pode ser usado efetivamente como um agente saneante contra enterococos a 100 ppm em 0,25 minutos. Ainda SHANON et alii (68), avaliando diferentes concentrações de cloro, notaram que 10 ppm de cloro livre, destruíram parcialmente os enterococos após 2 minutos de exposição, ao passo que 5 ppm por 30 minutos não destruíram por completo qualquer linhagem de enterococos.

SCHEUSNER et alii (65), observaram que ocorria injúria de células bacterianas quando expostas a uma solução de hipoclorito de sódio com 5,25% de cloro ativo no tempo de 60 segundos.

SADOVSKI & FABER (63), estudaram o efeito do hipoclorito de sódio em culturas de Streptococcus faecalis e Streptococcus faecium, tanto na fase logarítmica de crescimento como na fase estacionária, observando que a fase de crescimento não influenciava a resistência de tais microrganismos. O Streptococcus faecium apresentava a maior resistência aos efeitos do cloro numa concentração de 0,126 ppm de cloro disponível, com o tempo de contato de 30 segundos; o Streptococcus faecalis era reduzido em 85% nas mesmas circunstâncias. Quando usada uma

concentração de 0,168 ppm, mais de 50% da população de Streptococcus faecium sobreviveu, ao passo que não se recuperavam células viáveis de Streptococcus faecalis.

À temperatura 22°C e no pH 10, esporos de Bacillus (20), protegidos por matéria orgânica, podem sobreviver a ação de 2.000 ppm de cloro por várias horas, porém, quando na ausência da matéria orgânica, 99% dos esporos dos Bacillus foram destruídos em 31 minutos por 500 ppm de cloro.

Bacillus anthracis esporulados foram destruídos entre 15-45 minutos, quando usado cloro na faixa de 10 a 50 ppm, a um pH 8-9, à temperatura 20-25°C (75).

DYE et alii (22), estudaram o efeito do cloro em suspensão de vários esporos e relataram que em 200 ppm de cloro combinado (cloramina T), o Clostridium welchii foi o que apresentou maior resistência das oito diferentes espécies de esporos bacterianos estudados.

2.1.3 Uso do Cloro em Alimentos e superfícies.

Na prática industrial, com o objetivo de reduzir a contaminação da superfície de equipamentos e utensílios, o cloro tem sido o mais utilizado (5,51,53). Em alguns casos de alimentos também tem sido muito utilizado (47,49,51,60). Por outro

lado, o uso e a eficiência dos compostos de cloro na desinfecção de águas de abastecimento público já são bem reconhecidas.

Quando ao uso do cloro em pedaços de carnes MAR SHALL et alii (45), usando hipoclorito de sódio comercial com 200 a 250 mg/l sob pressão a jato, aplicado à superfície de pedaços de carne e em seguida estocando a 3°C, relataram que a redução da contagem foi de aproximadamente 97%. ANDERSON et alii (4), analisando redução microbiana na superfície de cortes de carne, também encontraram resultados semelhantes. Ainda ANDERSON (3), utilizando cloro com 200 a 250 ppm para aplicação em superfície de cortes de carne concluíram que aplicações de hipoclorito causam uma redução inicial significativa de 0,31 log. sendo que após incubação a 28°C por 48 horas observam um aumento na contagem de 0,53 log., não indicando efeito residual do cloro.

LEITÃO et alii (41), estudaram a redução dos microrganismos encontrados na folha de alface pelo efeito do hipoclorito de sódio nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/l e destacaram que nenhuma das concentrações reduziu de forma drástica a contaminação inicial.

CRISTOVÃO (18), avaliou o efeito germicida de um composto de cloro na concentração de 50 ppm, para reduzir a contaminação de folhas de alface e observou que a lavagem inicial reduzia em aproximadamente 80% da contaminação dos coliformes

das folhas. No entanto, a destruição posterior dos microrganismos pela ação do cloro era muito lenta, sendo necessário um período de exposição ao redor de 2 horas para diminuir em aproximadamente 80% da microflora remanescente.

Por outro lado, HOBBS & GILBERT (34), recomendaram que para reduzir ou eliminar os riscos de contaminação por Salmonella typhi, as folhas de alface deveriam ser lavadas em soluções contendo de 60 a 80 ppm de cloro livre, com um tempo de contato não inferior a 30 segundos.

Já com o uso do cloro para superfícies de equipamentos, HAYS et alii (33), avaliaram a capacidade de destruir microrganismos presentes em equipamentos de indústrias de latifúndios e relataram que o hipoclorito foi eficiente nas concentrações entre 25 a 50 ppm, desde que os equipamentos estivessem limpos e nas superfícies a alcalinidade fosse baixa.

MOSLEY et alii (48), usando vários microrganismos tais como E. coli, Salmonella derby, Staphylococcus sp. e outros, que em superfície de aço inoxidável foram submetidos a ação do hipoclorito de sódio na concentração de 12,5 e 25 ppm, encontraram que o hipoclorito foi muito eficaz como sanificante.

Segundo GUTHRIE (31), a dosagem de cloro recomendada para higienização de utensílios e equipamentos, quando em imersão ou circulação, é de 100 ppm; já para aspersão e nebuli-

zação é de 200 ppm, sendo que o tempo de exposição deverá ser de 1 a 2 minutos com uma temperatura em torno de 24°C.

A "U.S. Public Health Service Ordinance and Code Regulating Eating and Drinking Establishments" (55), estipula que quando o hipoclorito é usado para utensílios, os mesmos devem ser imersos no mínimo por 2 minutos em banho morno contendo no mínimo 50 ppm de cloro livre.

Quanto a atuação do cloro sobre a flora láctica, SGHEDONI (65), relatou que 0,001% de cloro interfere na contagem dos microrganismos na prova da redutase, em consequência da diminuição dos germes do leite.

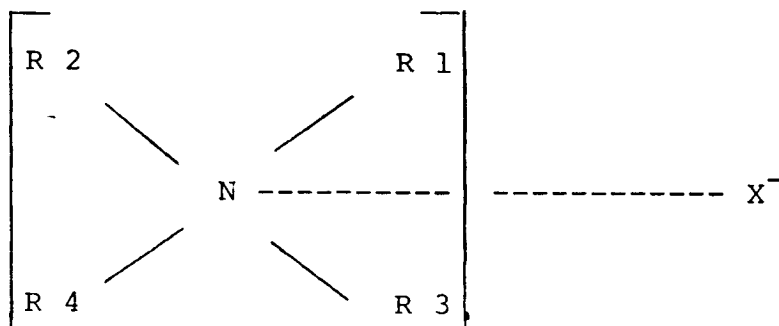
Por sua vez LEGGAT (40) também utilizando hipoclorito, testou a sua propriedade bactericida em presença de matéria orgânica (nata de leite) e concluiu que o desinfetante não foi bactericida a 0,01% e que o hipoclorito teve uma atuação diferente em relação às bactérias gram positivas e negativas.

ODLAUG & PFLUG (54) analisaram o efeito do cloro em água de resfriamento e concluíram que a presença do cloro na água era muito efetiva, reduzindo a microflora aeróbia total quando o ácido hipocloroso não dissociado era predominante e notou que quando o nível de ácido hipocloroso na água de resfriamento era superior a 1 ppm., a microflora predominante ficava restrita a esporios.

ITO & SEEGER (36), estudaram o efeito germicida do cloro em microrganismos presentes em águas de resfriamento de latas em indústrias de alimentos e mencionaram que as bactérias não esporogênicas eram destruídas de 99,8 a 99,9%, quando expostas durante 5 minutos numa solução com teor de cloro livre entre 0,01 a 0,07 ppm., num pH 7,0.

2.2 Uso de Compostos de Amônio Quaternário

Estes compostos são substâncias tensoativas catiônicas, com pequena atividade como detergentes, porém muito ativos como germicidas, sendo basicamente derivadas de compostos de amônio, pela substituição de um hidrogênio por radicais orgânicos, tendo o nitrogênio uma covalência de cinco (31). O nitrogênio polar carregado positivamente é agregado por uma longa cadeia de carbono (28).



R 1 - Grupos longos (C8 - C18) de alquila ou arila.

R 2, R 3, R 4 - Hidrogênio, grupos alquila, arila ou heterocíclico.

X⁻ - Anionte inorgânico, geralmente cloreto ou brometo.

2.2.1 Modo de ação

Estes compostos agem geralmente inativando as enzimas envolvidas na oxidação ou fermentação ou, ainda, provocando vasamento de constituintes celulares (31,55).

A formação de cátions parece ser um importante fator da ação dos compostos de amônio quaternário sobre a membrana bacteriana (28).

O CAQ precipita as proteínas seguindo-se danos da membrana celular (28).

A inibição das enzimas que estão envolvidas no transporte de elétrons da fosforilação oxidativa tem sido demonstrada com baixas concentrações de CAQ (32).

Os CAQ possuem a vantagem de permanecer relativamente estáveis na presença de matéria orgânica, altas temperaturas e serem ativos numa dupla faixa de pH (31,55).

DUM (21), BOTWRIGTH (12), relataram que a eficiência do CAQ não era afetada em presença de grande concentração de matéria orgânica, nem por refrigeração ou por aquecimento superior a 50°C por 18 dias.

As desvantagens dos CAQ consistem em serem pouco eficientes contra bactérias gram negativas (coliformes, psicrófilos) e ineficientes contra bacteriófagos (31,55).

Como desvantagens dos CAQ, cabe salientar que as bactérias gram positivas são mais susceptíveis que as gram negativas, porém a atividade contra microrganismos gram negativos pode ser aumentada com o uso do ácido etilenodiamina tetraacético pois este quebra alguns componentes da parede celular, facilitando a penetração do CAQ pela membrana (28).

2.2.2 Dosagem

Estudos iniciais realizados com estes compostos (CAQ) revelaram que a sua eficiência frente aos microrganismos era alta. FANSLAU (24) usando uma solução aquosa 1/1000, num tempo de 10 minutos, destruiu todos os Staphylococcus aureus. BLUMKE (11) concluiu que CAQ, tem uma grande ação inibidora sobre o Bacillus polimyxa, como também impede a germinação do esporo. LEGGAT (40) também utilizando CAQ testou a sua proprieda

de germicida em presença de matéria orgânica (película de leite) e concluiu que o desinfetante não é bactericida a 0,01%, mas já na concentração de 0,1% paralisou todas as multiplicações bacterianas, havendo pequena diferença entre os efeitos sobre os Gram-positivos e os Gram-negativos, porém maior sobre aqueles.

SCHEUSNER et alii (64), encontraram injúria celular para estafilococos quando se usava o composto quaternário de amônio numa solução com 50 µg/ml, principalmente.

ADAIR et alii (1), observaram resistência em Pseudomonas aeruginosa quando a concentração do sanificante era de 0,02%. Aumentaram depois o nível da concentração do sanificante para 0,36% e verificaram ainda tolerância das células; a 4% a cepa ainda resistiu.

Utilizando o caldo de triptona com glicose e extrato de levedura (TGY) acrescido de 750 µg/ml de CAQ, WASHAM et alii (81) notaram crescimento de Pseudomonas aeruginosa, e, variando o pH do meio, concluíram que a resistência do germe ocorria no pH entre 7,0 e 8,5. Os mesmos autores, (80) em outro trabalho, no mesmo caldo, selecionaram Pseudomonas com habilidade de crescer em 770 ppm de CAQ. Ainda WASHAM et alii (82), observaram colônias de Pseudomonas aeruginosa crescidas em caldo TGY + 500 ppm de CAQ e notaram que a morfologia das colônias de células sensíveis ao CAQ apresentaram-se granulares e homogêneas. Já as colônias resistentes ao CAQ, crescidas no mesmo

meio, apresentaram forma granular não homogênea e continham numerosas áreas densas. Com a ajuda do microscópio eletrônico, foi possível verificar que as células resistentes apresentavam-se menores que o habitual das Pseudomonas e ocorria ausência de flagelo.

SCHEUSNER et alii (63) submeteram células de Escherichia coli a um composto de amônio quaternário e detectaram inibição e injúria através de contagens comparativas entre ágar tripticase-soja e ágar vermelho violeta-bile.

SOPREY et alii (70) repicou E. coli diariamente em tubos de caldo nutriente que continham 28 µg/ml de CAQ. O microrganismo conseguiu crescer só até ao 14º dia. De forma idêntica repicou P. fluorescens e verificou que o crescimento só se deu até 12º dia.

CROCKER (19) notou variações nas características de Escherichia coli induzidas pela ação dos CAQ. As células resistentes perderam capacidade de produzir gás em meio líquido e apresentaram colônias pequenas, atípicas, no meio de ágar desoxicolato. As colônias também não apresentaram brilho metálico no meio confirmativo para coliformes.

O CAQ na concentração de 100 ppm foi testado nas condições da indústria como desinfetante provocando destruição de 99,9% de Escherichia coli no tempo de 2 minutos (20).

ANDERSON (3) utilizou 3,78 g/l de CAQ para aplicar em superfície de cortes de carne e notou que o sanificante reduziu a flora contaminante de 0,79 log para 0,03 log.

Uma outra experiência realizada com CAQ na redução da flora microbiana do leite, foi feita por SGHONI (66). O pesquisador adicionou 0,001% do sanificante ao leite cru e notou que ocorria redução na flora láctica imediatamente após adição e que tal redução não era tão significativa quando o leite mais CAQ era incubado por 24 ou 48 horas.

Na prática industrial para higienização e sanificação, o CAQ é aplicado em pH 6,0 ou mais, numa temperatura próxima aos 24°C, por um tempo de exposição de 2 minutos e numa concentração de 200 ppm, caso seja por imersão ou circulação. Já no caso de aspersão ou nebulização deve ser usada numa concentração de 400 ppm em 2 minutos (31).

2.2.3 Inativação do sanificante

A célula bacteriana atacada pelo CAQ poder ser recuperada pela inativação do CAQ. Este processo de recuperação pode ser feito em poucos minutos após a ação do sanificante; depois de um certo período o processo é irreversível (20).

WEBER and BLACK (83) descreveram que a lecitina

geralmente usada para inativar o CAQ não protege todos os tipos de células bacterianas e que deve ser dispersada por um emulsificante adequado.

O lubrol w às vezes é usado como agente dispersante para a lecitina, muito embora o lubrol w possa ser tóxico para certos tipos de bactéria. Assim é que cepas de S. diacetilactis não crescem em ágar que contenha 0,005% de lubrol ou em leite que contenha 0,05% (apud 20).

GARVIE & CLARK (29) encontraram que o lubrol w é um inativador satisfatório do CAQ para proteger E. coli, enquanto que para o S. aureus se torna necessário a adição da lecitina ao lubrol.

Na prática é usual inativar o CAQ com uma solução de lubrol w a 3%, misturada a uma solução de lecitina a 2% (20).

A recomendação da Association Official of Analytical Chemists (AOAC) consiste no uso de uma mistura da solução de Tween 80 ou lubrol a 6%, com a solução de lecitina a 4% (7).

Além da lecitina, Tween 80 e lubrol w pode ainda ser usado para neutralizar o CAQ o vermelho congo a 0,02%, solução de leite a 50%, estearato e outras substâncias aniônicas (20).

COLLINS, HSUEH e JOHANSSON (17) encontraram que o vermelho congo (tinta aniônica solúvel em ácido) usado na proporção de 10:1 em relação ao CAQ foi um inativador satisfatório e que até 400 ppm de vermelho congo não foi significativamente tóxico para E. coli e S. aureus.

MEANWELL (apud 20) encontrou cepas que prontamente cresceram em meio de ágar contendo 0,02% de vermelho congo. O vermelho congo nesta concentração é um inativador satisfatório para o CAQ, não causando prejuízo para E. coli e Streptococcus lactis.

Considerando ainda os inativadores do CAQ, MEANWELL (apud 20) relatou que a solução de leite a 50% é um neutralizador satisfatório para o CAQ.

O cloro usado a 100 ppm. também pode ser usado como inativador do CAQ, que residualmente pode subsistir nas superfícies desinfetadas mesmo após enxague (20).

Outro caso de inativação de CAQ ocorre quando se aumenta a alcalinidade para favorecer a efetividade deste sanificante. Então, em presença de gordura forma-se sabão que inativa parcialmente o CAQ (20).

2.3 Injúria de Células Microbianas

BUSTA (13) descreveu que a injúria celular pode ser causada pelo calor, frio, congelamento, irradiação ultra violeta, dessecação e por agentes químicos. Estes agentes químicos usados para sanificação nas indústrias de alimentos, induzem à injúria nas bactérias. Também os coliformes, após exposição ao calor ou agentes químicos, apresentaram-se menos reprodutivos nos meios seletivos que as células não expostas a tais agentes (64,72).

O mecanismo da recuperação de células injuriadas pelo calor ainda não tem sido bem elucidado, porém a síntese de r-RNA desempenha um importante papel no reparo de injúria (79).

TOMLINS & ORDAL (77), notaram que células de Salmonella typhimurium quando submetidas ao calor, sofriam injúria e verificaram que na recuperação dessas células, não ocorria síntese de ácido desoxiribonucleico, sendo que a síntese de ácido ribonucleico - ribossômico durante a recuperação, não foi expressivo. Notou ainda que uma pequena mas significativa quantidade de proteína foi formada durante o último período de recuperação. Ainda TOMLINS & ORDAL (76) relataram que a recuperação das células de S. typhimurium injuriadas pelo calor depende da formação de novas proteínas.

TOMLINS et alii (78), estudaram a biossíntese de lipídios durante a recuperação de S. typhimurium injuriadas pelo aquecimento. O resultado obtido demonstrou que ocorria inativação parcial da enzima ácido ciclopropano sintetase, durante a injúria. Ainda os mesmos autores, num outro trabalho (75), demonstraram que as enzimas envolvidas no ciclo tricarbóxico foram severamente inativadas nas células de S. aureus e S. typhimurium injuriadas pelo calor.

No entanto, para as células de S. aureus injuriadas pelo calor, a síntese de proteína não é envolvida no processo de recuperação e sim a síntese de ácidos nucleicos (69). O uso de antibióticos inibidores de proteína, acrescentados ao meio de cultura usado para recuperação de S. aureus injuriados pelo calor (55°C por 15 minutos), indica que a síntese de proteína não é comprometida no processo de recuperação das células porque estas crescem (69). Porém IANDOLO & ORDAL (35) empregando o uso de actinomicina D (inibidor de RNA) no meio de recuperação de S. aureus injuriada pelo calor verificaram que a recuperação foi suprimida por completo.

LEVINSON & HYATT (42) relataram que 94% dos esporos de B. subtilis submetidos ao aquecimento de 75-85°C conservaram o poder de germinar, porém eram incapazes de formar colônias.

Células de B. subtilis injuriadas pelo calor, na

presença de inibidores de síntese de proteína (clorofenicol) e i nibidores da síntese de parede celular (vancomicina e penicilina) recuperam-se. Estes agentes inibidores não tiveram portanto efeito durante a recuperação. Porém quando se usavam inibidores de RNA (actinomicina D) não houve, por completo, recuperação, pois não podia haver a síntese do RNA (46).

BEUCHAT & LECHOWICH (10) determinaram o ácido ribo nucleico de células de Streptococcus faecalis após injúria pe lo aquecimento e relataram que houve redução do RNA, porém o percentual reduzido não foi diretamente proporcional a redução de células viáveis.

Tanto esporos, como células vegetativas de B. sub tilis foram mais exigentes às necessidades nutricionais, após o tratamento térmico, do que as não expostas ao calor (23).

CLARCK et alii (15,16) encontraram resultados que in dicam a participação da síntese de RNA na recuperação das cêlu las de S. faecalis e S. typhimurium injuriadas pelo calor.

A injúria de E. coli pelo congelamento foi deter minada pela capacidade das células formarem colônias no ágar tripticase-soja com extrato de levedura e a não formação de co lônias em ágar violeta vermelho-bilis (58). Meios seletivos co

mo o desoxicolato com sais biliares inibiram diferentes sorotipos de Salmonella injuriadas pelo congelamento (38). Culturas de S. aureus submetidas à temperatura de 5°C apresentaram sensibilidade no meio seletivo ágar manitol ao passo que após a recuperação houve formação de colônias no meio seletivo (37). Já para as células de S. aureus injuriadas pelo frio, a síntese de RNA foi altamente necessária para o primeiro estágio de recuperação (27).

SINSKEY et alii (68) caracterizaram a injúria de Escherichia coli pelo frio e encontraram que a síntese do RNA precede a síntese de proteína, ao passo que a síntese de DNA ocorre no início do crescimento normal. RAY & SPECK (59) estudando também o processo metabólico de E. coli na recuperação da injúria pelo frio, obtiveram dados indicativos que as células sintetizam energia para formar trifostato de adenosina (TPA) e provavelmente utilizam-se do TPA no processo de recuperação, uma vez que a adição de TPA ao meio de cultura, facilitou a recuperação das células. Ainda os mesmos autores, num outro trabalho (56), caracterizando a recuperação de Salmonella anatum injuriada pelo frio, sugeriram que, no processo de recuperação, a célula também envolve energia para formar TPA. Têm-se verificado que na recuperação de E. coli injuriada pelo frio, o acréscimo de fosfato inorgânico ao meio de cultura, auxilia a recuperação das células injuriadas (60).

Na injúria de Salmonella anatum pelo uso do frio e dessecação, as células requereram síntese de proteína, ácido ribonucleico, ou mucopeptideo a parede celular, e ainda necessitaram de ATP sintetizada através da fosforilação oxidativa (57).

Células de Pseudomonas fluorescens e E. coli submetidas a estocagem em temperaturas abaixo de 0°C apresentaram injúria. Porém após recuperação de ambas as células foram notados danos referentes a motidade da célula (6). MacLEOAD et alii (44) relataram que a injúria metabólica das bactérias submetidas ao congelamento compromete a membrana celular. SORRELES (71) relatou que as células injuriadas pelo frio não apresentam mutações.

A injúria metabólica devido às baixas temperaturas, diminui a capacidade da bactéria sintetizar componentes essenciais para a célula, impendendo-a de crescer em meio mínimo (49,73). Porém não em meios ricos com complexos nitrogenados em que pode formar aminoácidos, peptídeos, vitaminas, purinas e pirimidina e outros materiais celulares essenciais (73).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Culturas

Foram utilizadas culturas de Clostridium perfringens e Salmonella typhi, ambas isoladas de alimentos no Brasil, a primeira obtida na Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola (FEAA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e a segunda no Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL).

3.1.2 Sanificantes

Foram usadas uma solução de hipoclorito de sódio com 9,5% cloro ativo e um composto de amônio quaternário (cloreto laurildimetilbenzilamônio) em solução a 50%.

3.1.3 Equipamento de laboratório

O equipamento utilizado constou do seguinte:

- Um aparelho para obtenção de atmosfera anaeróbia adaptado às nossas condições de trabalho, composto de jaras para anaerobiose constituídas de recipientes plásticos

ou painéis de pressão, a cujas tampas se adaptaram duas torneiras do tipo das utilizadas em instalações de gás: uma destinada à tubulação de borracha ligada à bomba de vácuo e a outra a idêntica tubulação em "T" para o manômetro e os cilindros de nitrogênio e gás carbônico.

- Microscópio óptico, marca Zeiss
- Microscópio de contraste de fase, marca Nikon, com equipamento fotográfico
- Potenciômetro, marca Micronal
- Balança analítica, marca Sauter, P.200g d=0,1mg
- Estufas, marca Fanem, com controle para $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Contador de colônias, marca Hellige
- Moldes metálicos com abertura retangular de 3 X 5 cm
- Zaragatoas com hastes de 14 cm de comprimento contendo em uma extremidade algodão não absorvente, com medida de 1,3 cm de diâmetro por 3,0 cm de comprimento
- Bomba de vácuo, 1/3 C.V.
- Bandeja de aço inoxidável 40 X 25 cm
- Tubos de ensaio 150 X 16 mm
- Demais materiais de uso comum em laboratório de microbiologia.

3.1.4 Meios de cultura e reagentes

- Caldo nutriente (Difco)
- Tioglicolato fluido
- Ágar para contagem global em placa (ACP) Difco
- Meio de Shahidi Ferguson Perfringens (SFP)segundo SHAHIDI & FERGUSON, 1971 (67)
- Solução tiosulfato de sódio a 5%
- Solução tween 80, a 6%
- Solução lecitina a 4%

3.2 Métodos

3.2.1 Exposição das culturas ao sanificante, em tubos de ensaio

As culturas foram reativadas à temperatura de 37°C, em dias sucessivos: o Clostridium perfringens no meio de tioglicolato e a Salmonella typhi em caldo nutriente.

3.2.1.1 - Foram retirados 3 ml da cultura de Clostridium perfringens para cada um de dois tubos

de ensaio com rosca: um contendo 3 ml de CAQ em solução a 50%, diluído a 1/2000 e outro contendo 3 ml de hipoclorito de sódio com 9,5% de cloro ativo, diluído a 1/500 (fig.1). O tempo de atuação do CAQ foi de 1 minuto e 30 segundos e o do hipoclorito de sódio 2 minutos. Após o tempo de exposição da cultura frente aos sanificantes, retirava-se 1 ml da mistura sanificante e cultura de Clostridium perfringens e transferia-se para tubos contendo 10 ml de tioglicolato. Incubava-se o conjunto por 24 horas a 37°C (fig. 1).

Em dias subsequentes (5 dias) repetia-se a exposição das culturas recuperadas do dia anterior frente aos sanificantes, como se fez no primeiro dia.

Ao sexto dia, após a atuação dos sanificantes como se fizera nos dias anteriores, retirava-se 1 ml da cultura com sanificante e transferia-se para um tubo de ensaio que continha 9 ml de água peptonada com neutralizante (tiosulfato de sódio para neutralizar hipoclorito de sódio e mistura da solução de tween 80 a 6%, com solução de lecitina a 4%, para neutralizar CAQ). Após homogeneização e neutralização por 1 minuto, faziam-se diluições seriadas e plaqueavam-se em meio de SFP. Incubavam-se as placas a 37°C por 24 horas e ao fim realizava-se a contagem das colônias. Posteriormente uma colônia de

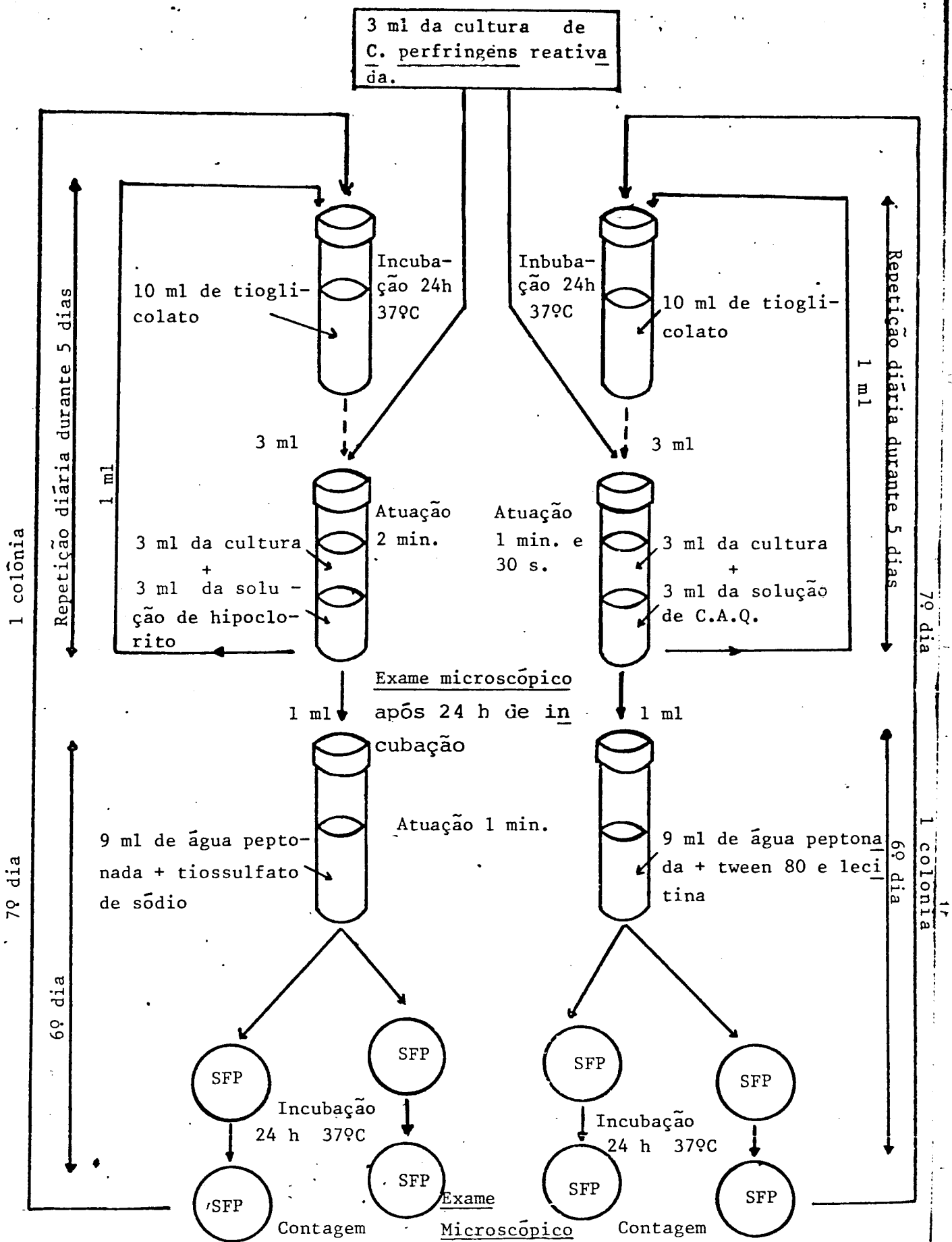


Figura 1. Esquema da metodologia empregada para aplicações repetidas de um composto de amônio quaternário e de hipoclorito de sódio sobre Clostridium perfringens, quando usado em tubos.

Clostridium perfringens era passada para tioglicolato e incubada por 24 horas a 37°C (fig. 1).

A partir desta cultura repetiam-se nas semanas seguintes todas as operações da primeira semana.

3.2.1.2 - A metodologia usada para a Salmonella typhi era semelhante à de 3.2.1.1, porém o meio de enriquecimento era caldo nutriente e o meio de plaqueamento era ACP (fig.2).

3.2.2 Exposição das culturas ao sanificante em superfície de aço inoxidável.

3.2.2.1 - Foram limpas e esterilizadas as duas superfícies de aço inoxidável (bandejas).

Sobre uma, posteriormente, jogava-se 5 ml de caldo de carne (simulando contaminação de indústria) espalhando-o com zaragatoa. Depois foi contaminada com 1 ml de cultura de Clostridium perfringens e 5 ml de hipoclorito de sódio. A bandeja era em seguida agitada para espalhar todos os líquidos.

Na outra superfície a técnica era semelhante, porém usava-se C.A.Q. ao invés de hipoclorito de sódio (fig.3).

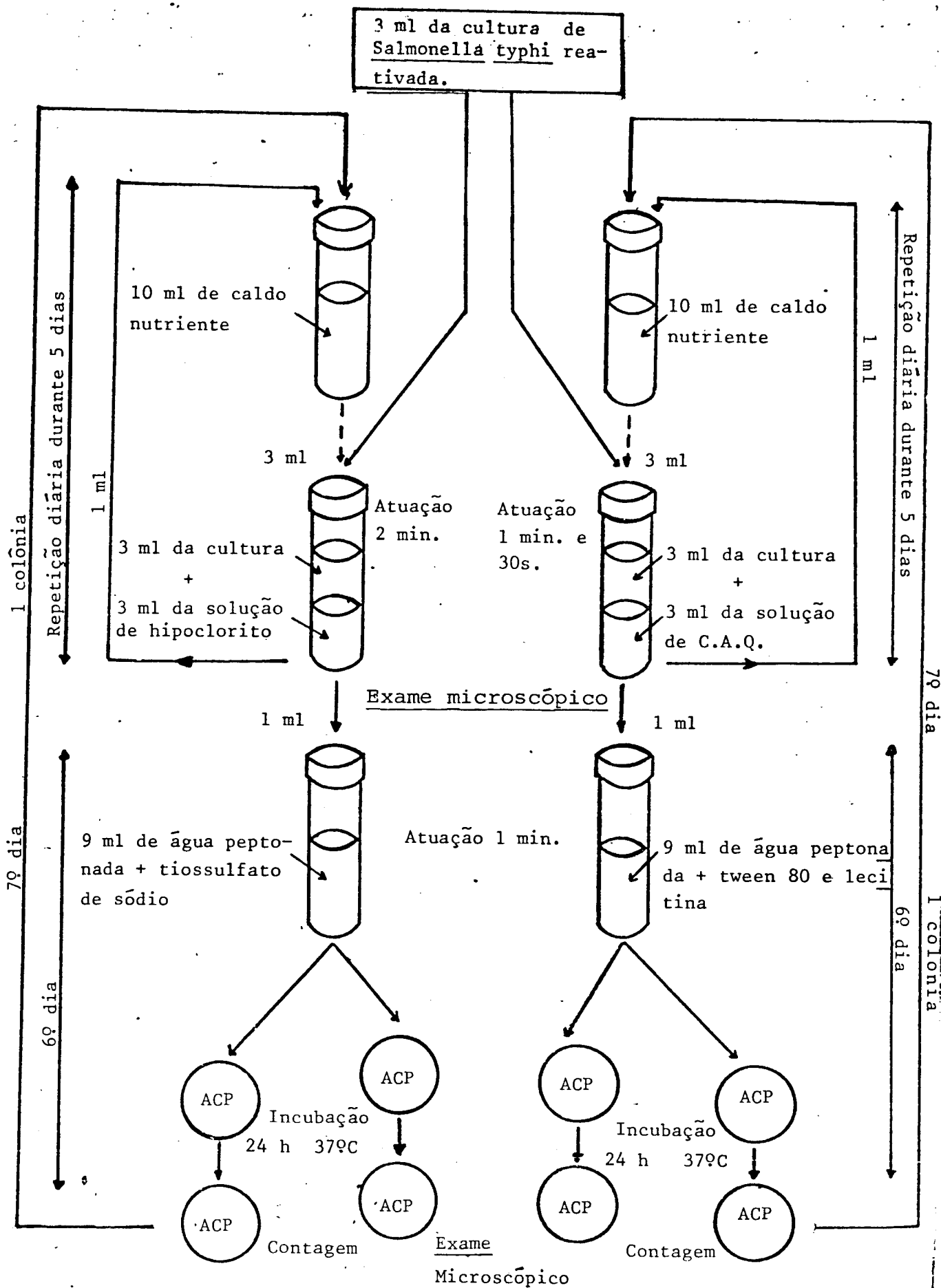


Figura 2. Esquema da metodologia empregada para aplicações repetidas de um composto de amônio quaternário e de hipoclorito de sódio sobre Salmonella typhi, quando usadas em tubos.

O tempo de atuação dos sanificantes era de 1 minuto e 30 segundos para C.A.Q. e 2 minutos para hipoclorito de sódio.

Usando-se cotonete, foram coletadas amostras em 3 diferentes partes de cada bandeja usando-se moldes metálicos e transportadas para tubos com 10 ml de tioglicolato.

Logo após, os tubos eram incubados por 24 horas a 37°C. Todas as operações foram repetidas diariamente até o 6º dia, ao fim do qual após exposição da cultura frente aos sanificantes, eram retiradas amostras com zaragatoa que se passava por 45 cm² da superfície e passadas para tubo de rosca contendo 9 ml de água peptona com os inibidores dos sanificantes (fig.3).

Após isto, faziam-se as diluições em série e plaqueavam-se em SFP. Incubavam-se as placas por 24 horas e realisava-se a contagem.

Posteriormente, ao 7º dia, uma colônia era passada para tioglicolato e incubada por 24 horas a 37°C.

Foram repetidas nas semanas seguintes todas estas operações com a cultura utilizada na primeira semana.

3.2.2.2 - A metodologia usada para Salmonella typhi (fig.4) era a mesma de 3.2.2.1, porém o meio de enriquecimento era caldo nutriente e o meio de plaqueamento era ACP.

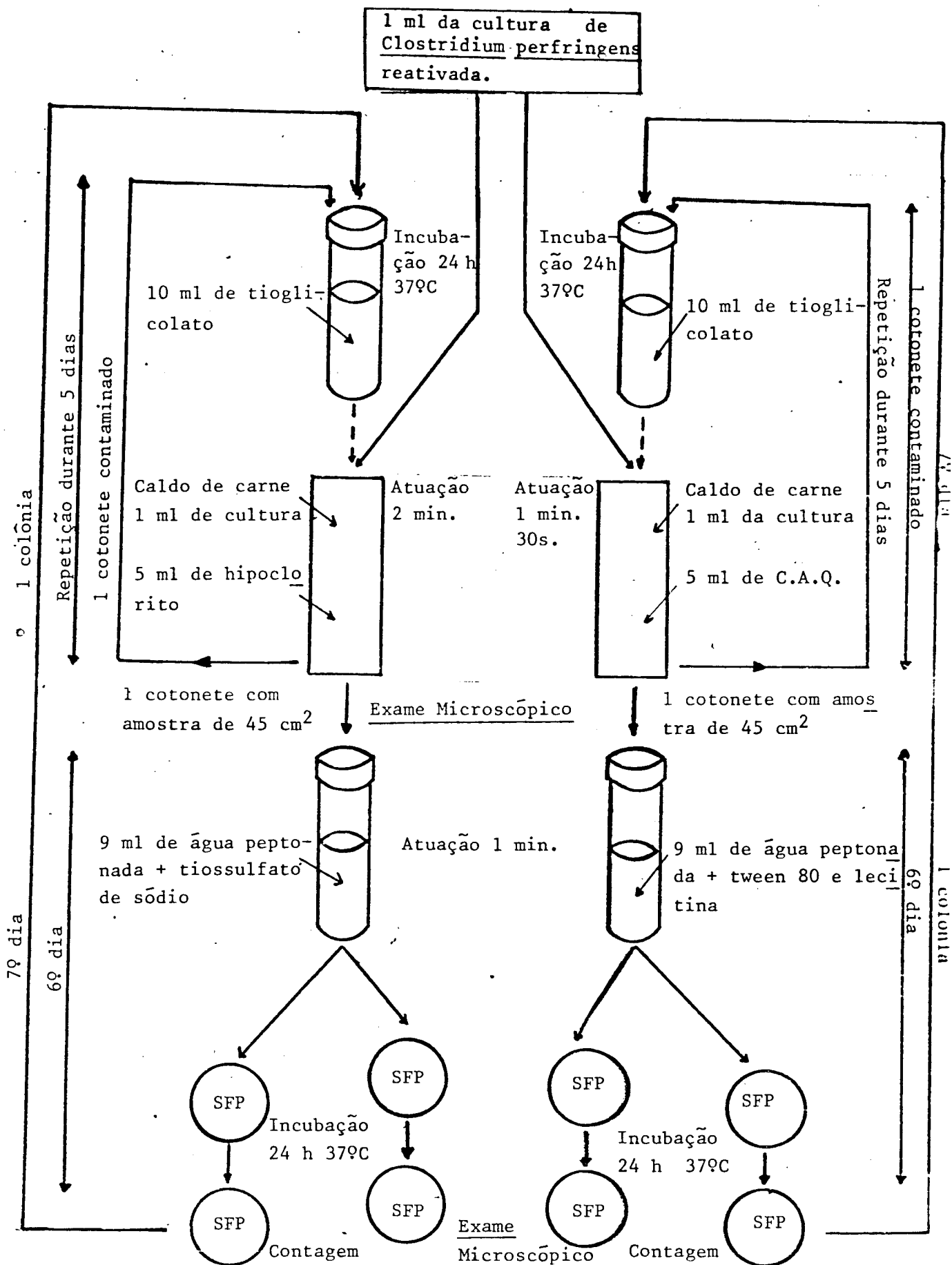


Figura 3. Esquema da metodologia empregada para aplicação repetidas de um composto de amônio quaternário e de hipoclorito de sódio sobre Clostridium perfringens, quando usadas superfícies.

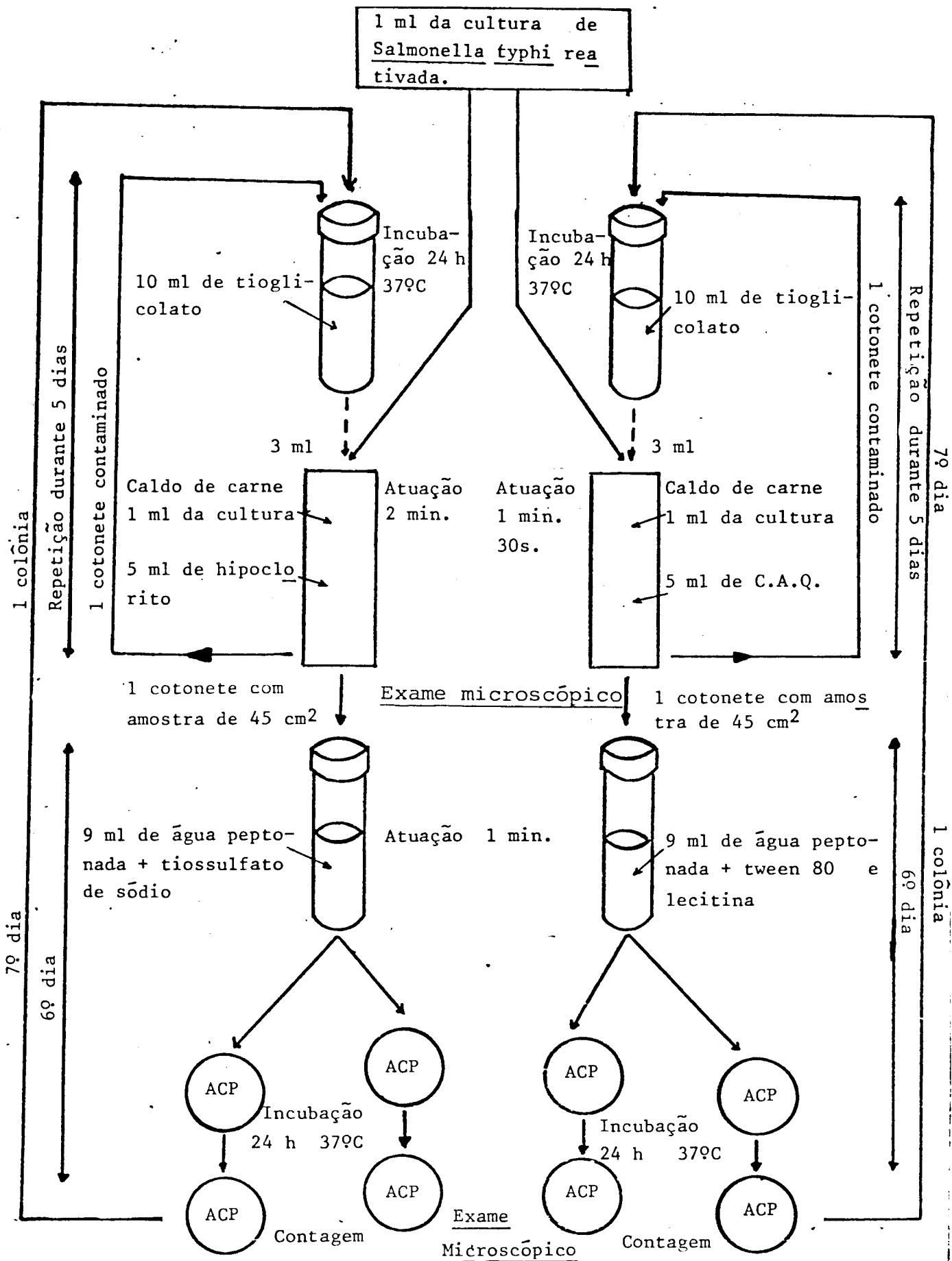


Figura 4. Esquema da metodologia empregada para aplicações repetidas de um composto de amônio quaternário e de hipoclorito de sódio sobre *Salmonella typhi*, quando usadas superfícies.

3.2.3 Coeficiente fenólico

O coeficiente fenólico para os microrganismos e sanificantes foi medido pelo método de Rideal (7), no início da pesquisa e a cada quatro semanas.

3.2.4 Dosagem de cloro ativo

A dosagem do cloro ativo para a solução de hipoclorito foi efetuada pelo método iodométrico, no início da pesquisa e todas as semanas, segundo AWWA/APH/WPCA (2).

3.2.5 Exame microscópico

O exame microscópico dos microrganismos foi feito, após coloração pelo método de Gram, como se segue.

3.2.5.1 - Exame do Clostridium perfringens no 1º dia após atuação do hipoclorito por 2 minutos e do C.A.Q. por 1 minuto e 30 segundos (fig.1 e 3), e também depois de 24 horas adicionais de incubação dos tubos.

3.2.5.2 - Exame de todos os microganismos ao quinto dia das semanas após a atuação do hipoclorito por 2 minutos e do C.A.Q. por 1 minuto e 30 segundos (fig. 1,2,3,4).

3.2.5.3 - Exame de todos os microganismos ao sétimo dia das semanas, a partir das colônias (fig. 1,2,3,4).

4 RESULTADOS

4.1 Contagens dos Microrganismos

4.1.1 Clostridium perfringens

O quadro 1 mostra as contagens das culturas de Clostridium perfringens sujeitas a ação contínua de hipoclorito de sódio e de CAQ, em tubo de ensaio.

O hipoclorito, quando usado em tubo, praticamente não provocou redução nem aumento da contagem até ao 56 dia. Posteriormente, as contagens aumentaram até ao 105 dias para depois manterem-se constantes (quadro 1 e fig. 5).

Já com o hipoclorito de sódio usado em superfície de aço inoxidável, dos 49 dias em diante, as células de Clostridium perfringens sofreram uma redução até desaparecerem (quadro 1, fig. 5).

Com as células de Clostridium perfringens sujeitas ao CAQ, em tubos ou em superfície, houve uma redução gradativa na contagem, sendo que aos 56 dias não ocorreu mais crescimento em tubos e aos 63 dias não ocorreu crescimento em superfícies (quadro 1, fig.5).

Quadro 1 - Contagens de Clostridium perfringens (microorganismos/cm³) após aplicação de hipoclorito de sódio (diluição 1/500 da solução com 9,5% de cloro ativo), e cloreto lauridimetil benzilamônio (diluição 1/2000 da solução de 50% do sanificante).

Dias	HT	HS	QT	QS
07φ	4,3 x 10 ⁶	1,8 x 10 ³	9,2 x 10 ⁴	1,7 x 10 ³
14φ	3,6 x 10 ⁶	1,2 x 10 ³	7,6 x 10 ⁴	1,1 x 10 ³
21φ	4,3 x 10 ⁶	0,5 x 10 ³	4,4 x 10 ⁴	0,7 x 10 ³
28φ	4,1 x 10 ⁶	0,4 x 10 ³	2,8 x 10 ⁴	0,3 x 10 ³
35φ	3,9 x 10 ⁶	0,5 x 10 ³	3,4 x 10 ⁴	0,2 x 10 ³
42φ	2,6 x 10 ⁶	0,3 x 10 ³	2,4 x 10 ³	0,2 x 10 ³
49φ	1,9 x 10 ⁶	0,1 x 10 ³	1,0 x 10 ³	0,7 x 10 ²
56φ	1,3 x 10 ⁶	0,4 x 10 ²	-	0,2 x 10 ²
63φ	1,0 x 10 ⁷	-	-	-
70φ	3,0 x 10 ⁸	-	-	-
77φ	1,5 x 10 ⁹	-	-	-
84φ	7,2 x 10 ⁹	-	-	-
91φ	8,6 x 10 ⁹	-	-	-
98φ	2,3 x 10 ¹⁰	-	-	-
105φ	1,9 x 10 ¹¹	-	-	-
112φ	1,3 x 10 ¹¹	-	-	-
119φ	2,0 x 10 ¹¹	-	-	-
126φ	1,9 x 10 ¹¹	-	-	-
133φ	2,2 x 10 ¹¹	-	-	-

HT = hipoclorito em tubo

HS = hipoclorito em superfície

QT = C.A.Q. em tubo

QS = C.A.Q. em superfície

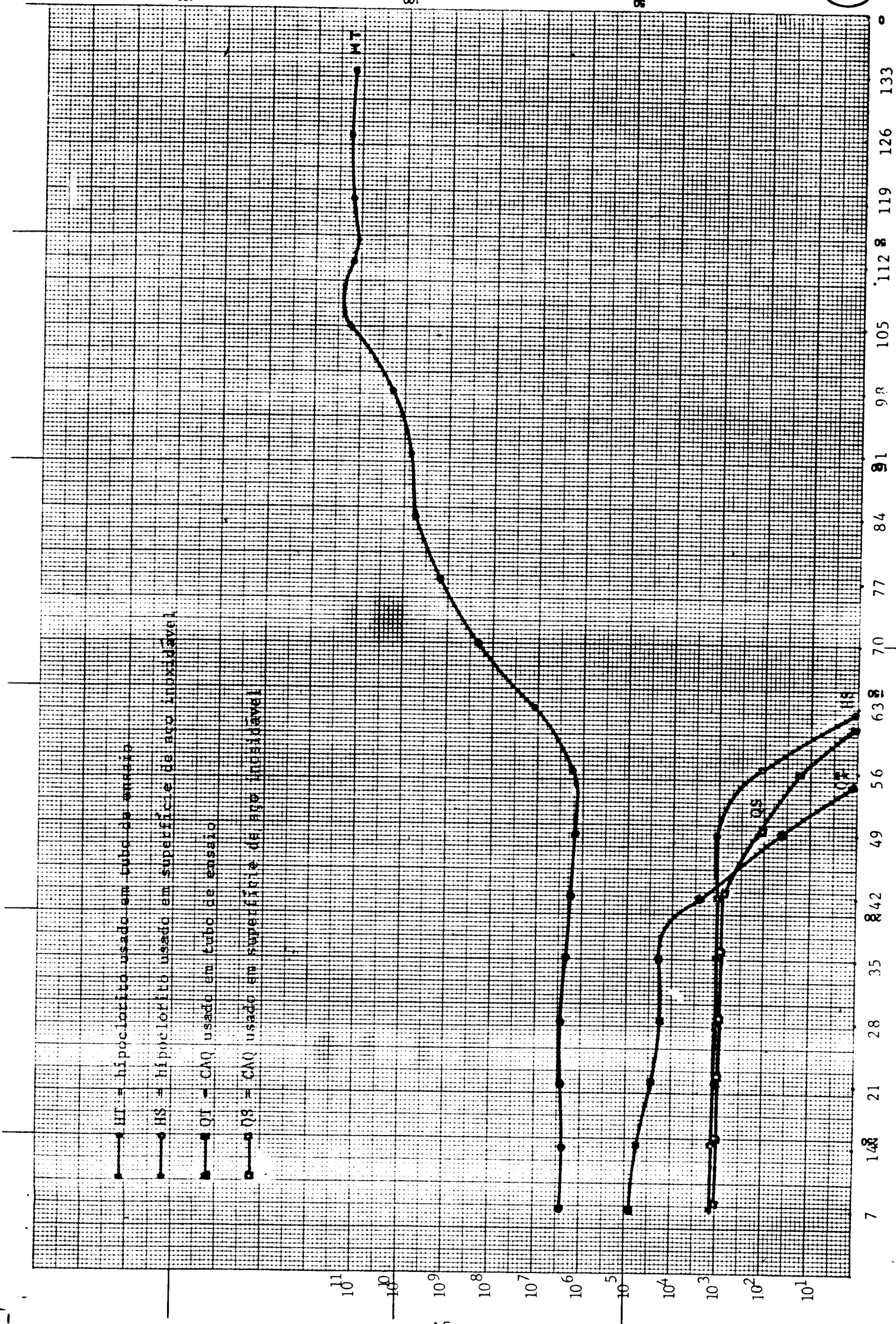


Fig. 5. Contagens de Clostridium perfringens sob aplicação contínua de hipoclorito e CAO.

4.1.2 Salmonella typhi

Os dados obtidos para Salmonella typhi mostraram que os microrganismos, quando na presença de hipoclorito de sódio em tubo, se mativeram aproximadamente constantes em número até aos 28 dias, diminuindo em seguida até aos 42 dias; então voltaram a aumentar até aos 70 dias, a partir dos quais se mativeram mais ou menos constantes (quadro 2, fig.6).

Quanto a Salmonella typhi em hipoclorito de sódio, na superfície de aço inoxidável, a contagem manteve-se constante até aos 21 dias, entre os 28 e 42 dias foi mais elevada, para então as contagens decrescerem até aos 77 dias quando atingiram zero (quadro 2, fig.6).

Já para o CAQ, em tubo, as células de Salmonella typhi sofreram um decréscimo ao longo do tempo chegando a zero aos 56 dias (quadro 2, fig.6).

Em superfície as contagens atingiram zero aos 98 dias (quadro 2, fig.6).

Em resumo verificou-se que, em todas as aplicações de sanificante, os microrganismos foram exterminados, com exceção da aplicação de hipoclorito em tubos.

Quadro 2 - Contagens de Salmonella typhi (microrganismos/cm³) após aplicação contínua de hipoclorito de sódio (diluição 1/500 da solução com 9,5% de cloro ativo), e cloreto laurildimetil benzilamônio (diluição 1/2000 da solução de 50% de sanificante).

Dias	HT	HS	QT	QS
07φ	2,6 x 10 ⁸	2,0 x 10 ³	9,2 x 10 ⁴	1,9 x 10 ³
14φ	2,2 x 10 ⁸	3,2 x 10 ³	7,6 x 10 ⁴	1,7 x 10 ³
21φ	2,4 x 10 ⁸	2,7 x 10 ³	8,4 x 10 ⁴	1,4 x 10 ³
28φ	1,6 x 10 ⁸	2,0 x 10 ⁵	5,4 x 10 ⁴	1,2 x 10 ³
35φ	5,0 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁵	3,0 x 10 ³	1,6 x 10 ³
42φ	3,2 x 10 ⁷	1,7 x 10 ⁵	2,4 x 10 ³	1,0 x 10 ³
49φ	9,8 x 10 ⁷	3,4 x 10 ³	1,0 x 10 ³	1,0 x 10 ³
56φ	1,7 x 10 ⁸	1,8 x 10 ³	-	1,6 x 10 ³
63φ	1,5 x 10 ⁸	1,0 x 10 ³	-	1,5 x 10 ³
70φ	2,9 x 10 ⁹	1,0 x 10 ¹	-	0,2 x 10 ³
77φ	3,2 x 10 ⁹	-	-	0,1 x 10 ²
84φ	2,8 x 10 ⁹	-	-	0,8 x 10 ²
91φ	3,6 x 10 ⁹	-	-	1,5 x 10
98φ	3,4 x 10 ⁹	-	-	-
105φ	3,0 x 10 ⁹	-	-	-
112φ	3,2 x 10 ⁹	-	-	-
119φ	3,8 x 10 ⁹	-	-	-
126φ	3,6 x 10 ⁹	-	-	-
133φ	4,0 x 10 ⁹	-	-	-

HT= hipoclorito em tubo

HS= Hipoclorito em superfície

QT= C.A.Q. em tubo

QS= C.A.Q. em superfície

HI = hipoclorito usado em tubo de ensaio
 HS = hipoclorito usado em superfície de aço inoxidável
 NI = CAQ usado em tubo de ensaio
 OS = CAQ usado em superfície de aço inoxidável

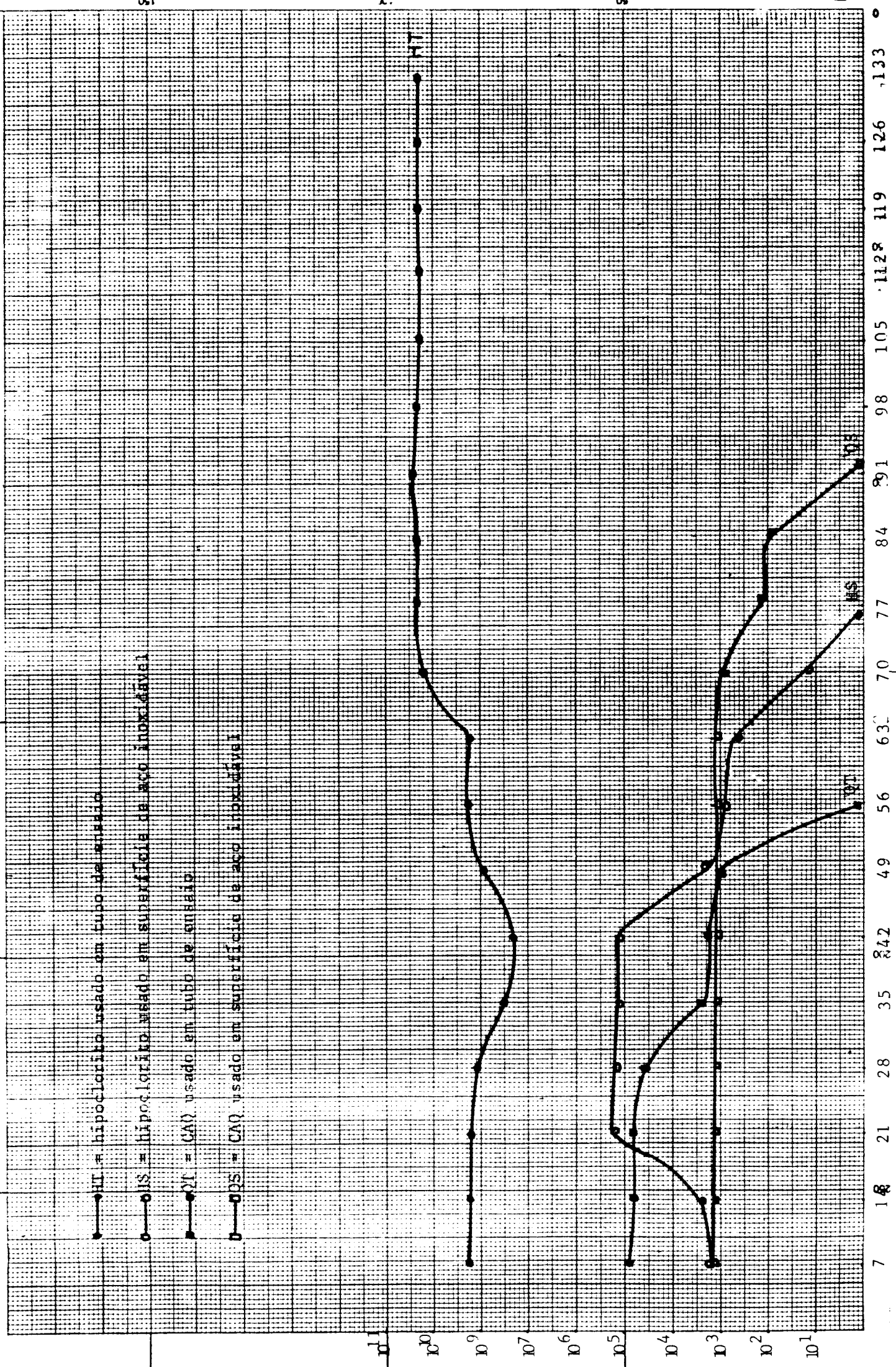


Fig. 6. Contagens de Salmonella (vnhi)

4.2 Coeficiente Fenólico

4.2.1 Clostridium perfringens

As células de Clostridium perfringens em tubos em que se usou hipoclorito apresentaram o mesmo comportamento, aproximadamente, do começo ao fim da pesquisa (quadro 3 e 4).

Em superfície de aço inoxidável aos 56 dias, as células acusaram sensibilidade maior ao sanificante (quadro 3 e 5).

As células de Clostridium perfringens em tubos em que se usou CAQ se tornaram mais sensíveis ao sanificante (quadro 6 e 7).

Em superfície sucedeu fato análogo (quadro 6 e 8).

4.2.2 Salmonella typhi

As células de Salmonella typhi em tubos em que se usou hipoclorito apresentaram uma sensibilidade aproximadamente constante (quadro 9 e 10), com exceções da que apresentou-se por volta dos 56 dias um tanto maior.

Em superfície a sensibilidade das células aumen

tou (quadro 9 e 11).

Usando CAQ em tubo a sensibilidade manteve-se inalterada até aos 28 dias (quadro 12 e 13). Porém aos 56 dias não havia mais microrganismos.

Quando a aplicação foi em superfície apareceu uma sensibilidade aproximadamente igual (quadro 12 e 14).

Quadro 3 Coeficiente fenólico de Clostridium perfringens antes do desenvolvimento da pesquisa.

Dia de Observação	Tempo	Fenol					Hipoclorito de sódio				
		$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{60}$	$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{300}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{600}$
0 dia	6 min.	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
	4 min.	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	2 min.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Quadro 4 Coeficiente fenólico de Clostridium perfringens su
jeito a exposições ao hipoclorito de sódio em tubo.

Dia da observação	Tempo	Fenol					hipoclorito de sódio				
		Diluição	$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{110}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{300}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{500}$
28 dia	6 min.	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
	4 min.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	2 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56 dia	6 min.	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
	4 min.	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+
	2 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
84 dia	6 min.	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
	4 min.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	2 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
112 dia	6 min.	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	4 min.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	2 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Quadro 5 Coeficiente fenólico de Clostridium perfringens su
 jeito a exposições ao hipoclorito de sódio, em su
 pêrficie.

Dia da Observação	Tempo	Fenol					hipoclorito de sódio				
		$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{110}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{300}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{600}$
28 dia	6 min.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
	4 min.	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	2 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56 dia	6 min.	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	4 min.	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
	2 min.	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+

Quadro 6 Coeficiente fenólico de Clostridium perfringens antes do desenvolvimento da pesquisa.

Tempo de Observação	Tempo	Fenol					C. A. Q.				
		$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{60}$	$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{600}$	$\frac{1}{700}$	$\frac{1}{800}$
0 dia	4.5 min.	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	3.0 min.	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	1.5 min.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

C.A.Q = Composto de amônio quaternário

Quadro 7 Coeficiente fenólico de Clostridium perfringens su jeito a uma exposição de 28 dias a um composto de amônio quaternário, em tubo.

Dia da Observação	Tempo	Fenol					C. A. Q.				
		$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{110}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{600}$	$\frac{1}{700}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{900}$
28 dia	4.5 min.	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	3.0 min.	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	1.5 min.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

C.A.Q = Composto de amônio quaternário

Quadro 8. Coeficiente fenólico de Clostridium perfringens sujeito a uma exposição de 28 dias a um composto de amônio quaternário, em superfície.

Dia da Observação	Tempo	Fenol					C. A. Q.				
		$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{110}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{600}$	$\frac{1}{700}$	$\frac{1}{800}$	$\frac{1}{900}$
28 dia	4.5 min.	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	3.0 min.	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	1.5 min.	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

C.A.Q = Composto de amônio quaternário

Quadro 9 Coeficiente fenólico de Salmonella typhi antes do desenvolvimento da pesquisa.

Dia da Observação	Tempo	Fenol					hipoclorito de sódio				
		Diluição	$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{60}$	$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{300}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{500}$
0 dia	6 min.	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	4 min.	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
	2 min.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Quadro 10 Coeficiente fenólico de Salmonella typhi sujeita a exposições ao hipoclorito de sódio, em tubo.

Dia da Observação	Tempo	Fenol					hipoclorito de sódio				
		$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{60}$	$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$	$\frac{1}{200}$	$\frac{1}{300}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{600}$
28 dia	6 min.	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	4 min.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	2 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56 dia	6 min.	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	4 min.	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
	2 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
84 dia	6 min.	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
	4 min.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	2 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
112 dia	6 min.	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
	4 min.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	2 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Quadro 11 Coeficiente fenólico de Salmonella typhi sujeita a exposições ao hipoclorito de sódio, superfície.

Dia da observação	Tempo	Fenol					hipoclorito de sódio				
		$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$	$\frac{1}{100}$	$\frac{1}{110}$	$\frac{1}{300}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{600}$	$\frac{1}{700}$
28 dia	6 min.	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+
	4 min.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
	2 min.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
56 dia	6 min.	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	4 min.	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	2 min.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Quadro 12 Coeficiente fenólico de Salmonella typhi antes do desenvolvimento da pesquisa.

Dia da Observação	Tempo	Fenol					C. A. Q.				
		$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{60}$	$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{600}$	$\frac{1}{700}$	$\frac{1}{800}$
0 dia	4.5 min.	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
	2.0 min.	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
	1.5 min.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

C.A.Q = Composto de amônio quaternário

Quadro 13 Coeficiente fenólico de Salmonella typhi sujeita a uma exposição de 28 dias a um composto de amônio quaternário, em tubo.

Dia da Observação	Tempo	Fenol					C. A. Q.				
		$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{60}$	$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{600}$	$\frac{1}{700}$	$\frac{1}{800}$
28 dia	4.5 min.	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	3.0 min.	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
	1.5 min.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

C.A.Q = Composto de amônio quaternário

Quadro 14 Coeficiente fenólico de Salmonella typhi sujeito a uma exposição de 28 dias a um composto de amônio quaternário em superfície.

Dia da Observação	Tempo	Fenol					C. A. Q.				
		$\frac{1}{50}$	$\frac{1}{60}$	$\frac{1}{70}$	$\frac{1}{80}$	$\frac{1}{90}$	$\frac{1}{400}$	$\frac{1}{500}$	$\frac{1}{600}$	$\frac{1}{700}$	$\frac{1}{800}$
28 dia	4.5 min.	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	3.0 min.	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
	1.5 min.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+
56 dia	4.5 min.	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
	3.0 min.	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
	1.5 min.	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

C.A.Q = Composto de amônio quaternário

4.3 Exame Microscópico

4.3.1. Clostridium perfringens

4.3.1.1 - Algumas células do microrganismo no 1º dia de atuação do sanificante esporularam, outras não e muitas morriam. As imagens ao fim de 24 horas de atuação do sanificante sobre o microrganismo eram semelhantes às anteriores (fig.7).

4.3.1.2 - Em tubos ao quinto dia antes de se criar resistência, as células sobreviventes apresentaram modificações morfológicas: eram compridas, em cadeia, curvas enoveladas e com estrutura interna diferente das normais (fig. 8 e 9).

4.3.1.3 - Em tubos no exame ao sétimo dia apresentaram as mesmas alterações de células que as mencionadas acima (fig. 10 e 11), mas não tão pronunciadas.

Após 63 dias de aplicação dos sanificantes, aqueles microrganismos que ficaram resistentes, apresentaram predominantemente formas similares às normais (fig.12 e 13).

4.3.2 Salmonella typhi

Os exames ao longo do tempo em que foi feita a pesquisa mostraram células mortas, células com condensações de cromatina e outras alterações morfológicas (fig.14). Porém quando apresentaram resistência ao hipoclorito (em tubo), as formas voltaram ao normal (fig. 15).

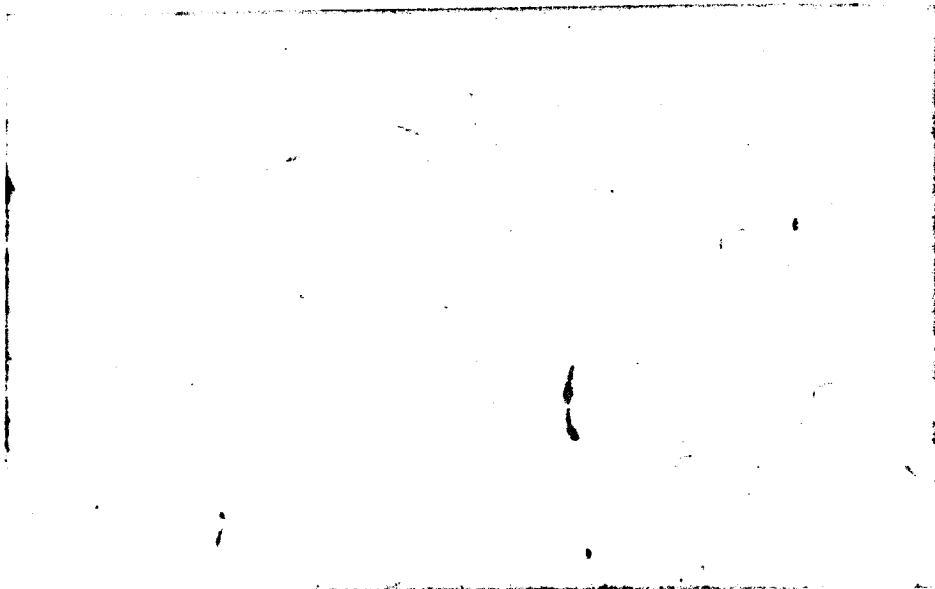


Figura 7. Clostridium perfringens no primeiro dia de atuação de C.A.Q. por 1 min. e 30 s. seguidos de 24 h. de atuação. Aumento 1200 x.

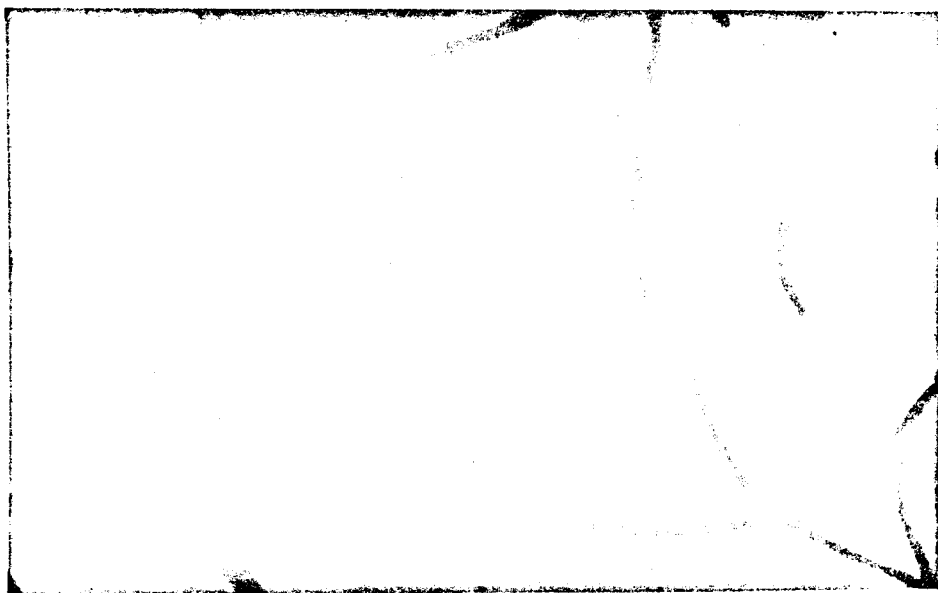


Figura 8. Clostridium perfringens ao 59 dia de atuação de C.A.Q. por 1 min. e 30 s. por 2 min. Aumento 1500 x.

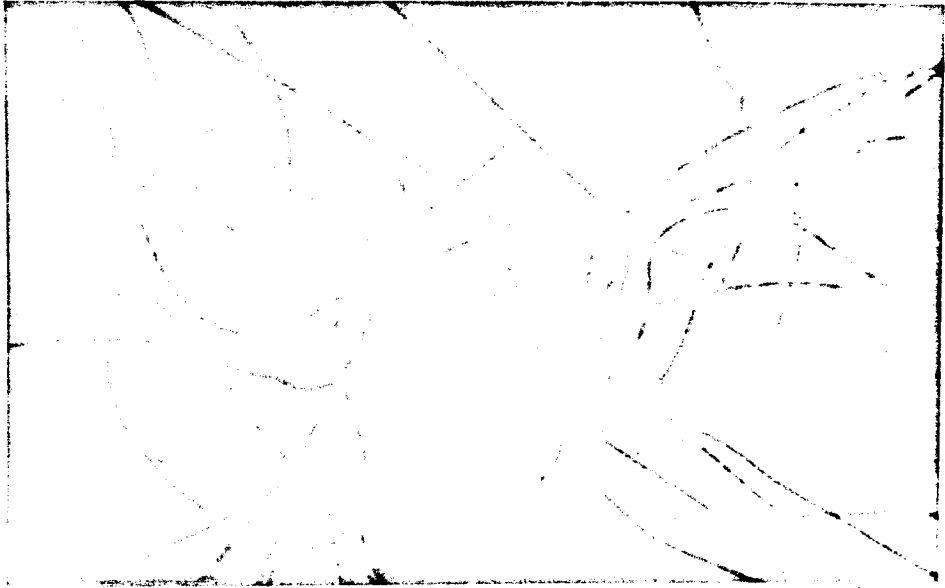


Figura 9. Clostridium perfringens ao 59 dia de atuação em hipoclorito por 2 min. Aumento 1200 x.

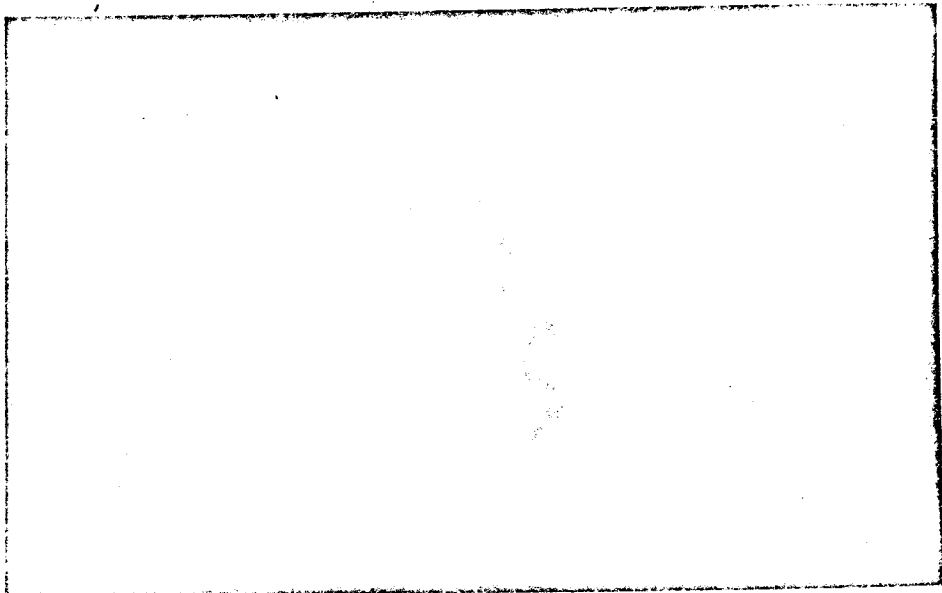


Figura 10. Clostridium perfringens ao 79 dia de atuação do hipoclorito por 2 min. Aumento 1200 x.

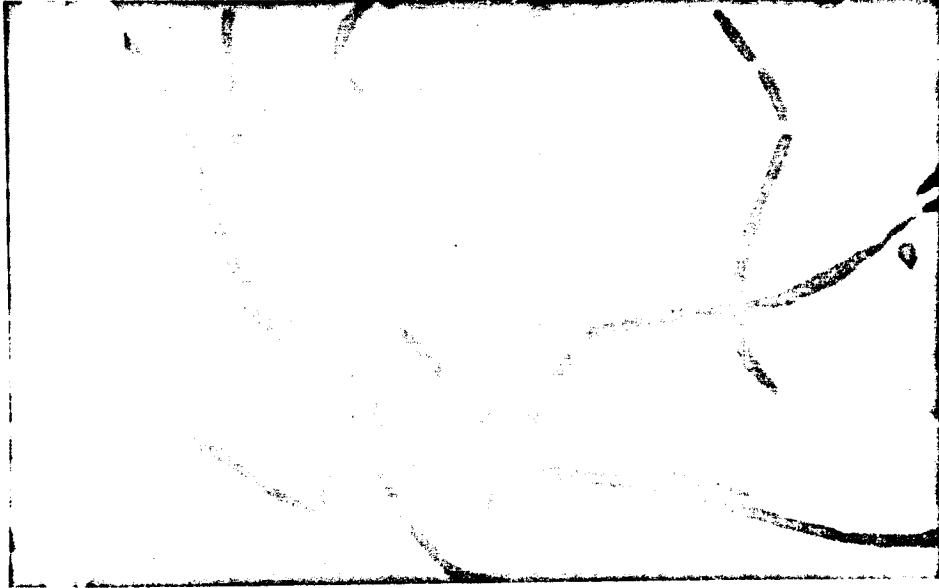


Figura 11. Clostridium perfringens ao 79 dia de atuação do hipoclorito por 2 min. Aumento 1500 x.

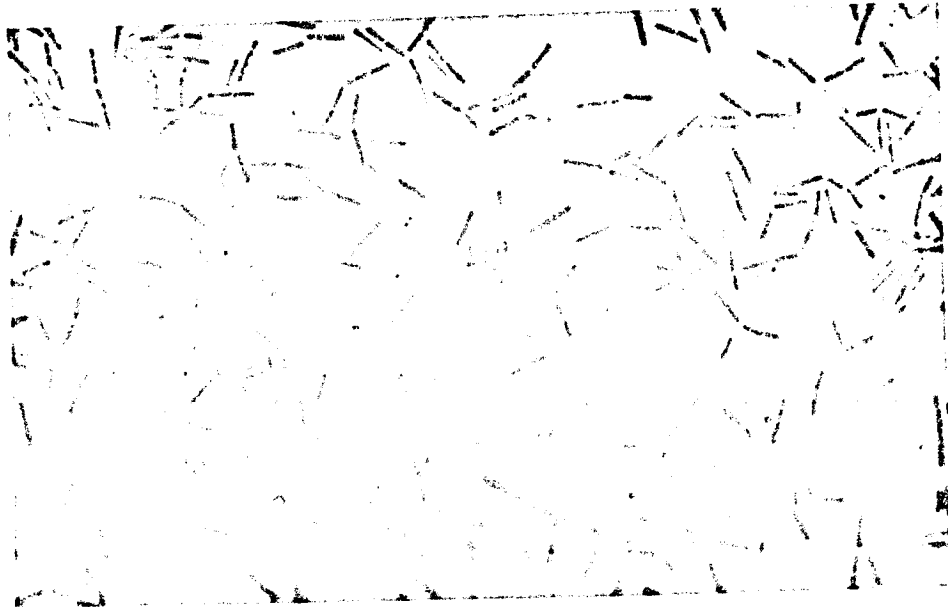


Figura 12. Células de Clostridium perfringens ao 639 dias de atuação do hipoclorito por 2 min. Aumento 1200 x.

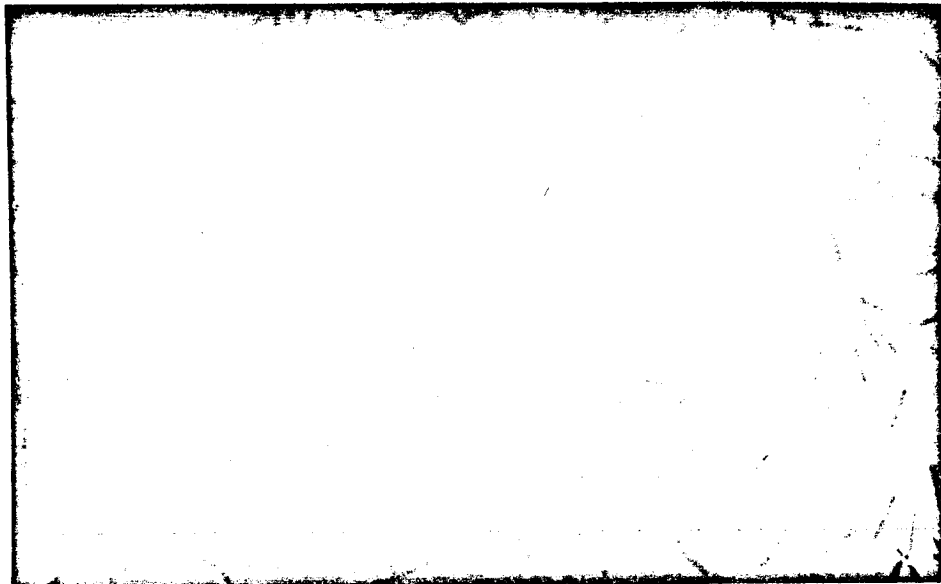


Figura 13. Células de Clostridium perfringens ao 63º dias de atuação do hipoclorito por 2 min. Aumento 1200 x.

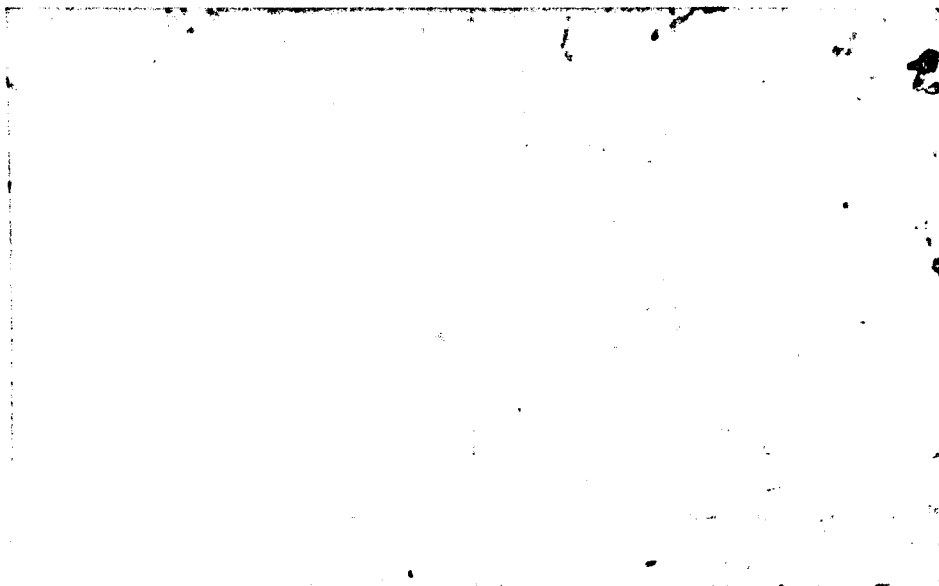


Figura 14. Salmonella typhi no 5º dia de atuação do hipoclorito por 2 min. Aumento 1200 x.

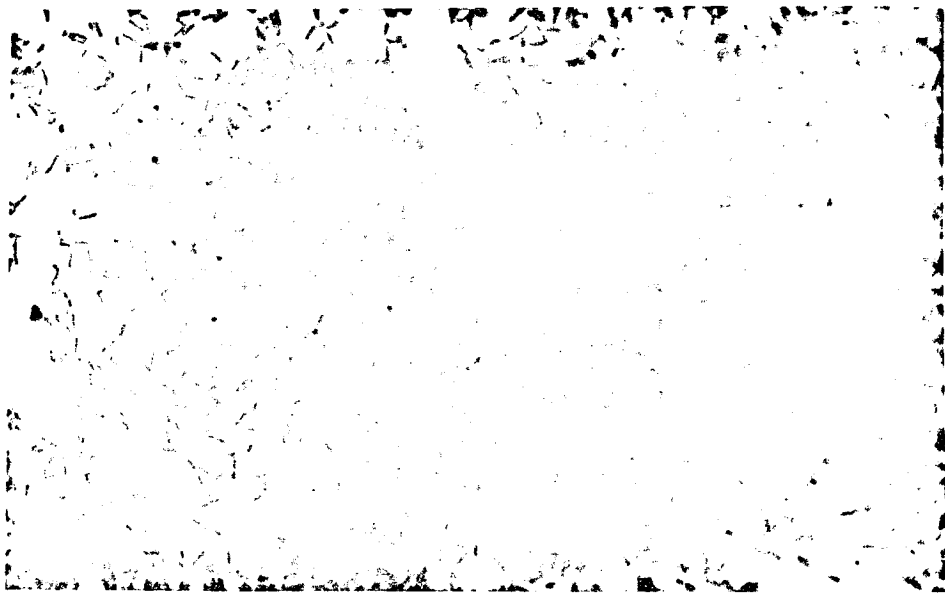


Figura 15. Salmonella typhi no 7º dia de atuação do hipoclorito por 2 min.
Aumento 1200 x.

5 DISCUSSÃO

5.1 Ação de Hipoclorito em Tubos

A aplicação de hipoclorito de sódio nas circunstâncias da pesquisa criou resistência dos dois microrganismos, Clostridium perfringens e Salmonella typhi a esse sanificante, quando se usaram tubos de ensaio. Contagens microbianas chegaram a aumentar claramente, com o Clostridium perfringens, e não muito pronunciadamente com a Salmonella typhi (Quadros 1 e 2 e fig. 5 e 6).

Essa resistência frente ao hipoclorito, objetivada pelas contagens dos microrganismos, foi também confirmada ao longo da pesquisa pela mesma sensibilidade aproximada do microrganismo, denunciada pelo coeficiente fenólico, como se vê no Quadro 4 e 10.

Destes dois microrganismos, a Salmonella typhi parece ter sofrido uma fase mais crítica que o Clostridium perfringens, pois aquela evidenciou uma queda clara de contagem entre o 35º e 56º dia (Quadro 2 e fig. 6) e uma maior sensibilidade quando estudada através do coeficiente fenólico (Quadro 10). Já o Clostridium perfringens manteve aproximadamente as mesmas contagens (Quadro 1 e fig. 5) e a mesma sensibilidade frente

hipoclorito, no método de Rideal (Quadro 4).

O exame microscópico, ao mostrar o que se passou com os microrganismos, também confirma a resistência. O Clostridium perfringens procurou resistir inicialmente ao sanificante, formando esporos (fig.7), o que normalmente não se consegue em laboratório, a não ser com meios especiais. As suas formas anômalas aparecem depois e mantêm-se até por volta do 56º dias; por fim voltam ao normal na fase em que as contagens são maiores, quando resiste facilmente ao sanificante. A Salmonella typhi também apresentou inicialmente formas alteradas e, por fim, normais.

É de admitir que a dosagem do sanificante usada com o Clostridium perfringens foi menos injuriante para este microrganismo do que a dosagem que se usou com a Salmonella typhi.

5.2 Ação de CAQ em Tubos

Ainda em tubos, os dois microrganismos não resistiram ao CAQ. É possível que doses menores deste sanificante, se fossem estabelecidas, pudessem ter criado resistência.

5.3 Ação do hipoclorito em superfícies

Quando se usou hipoclorito em superfície, as células microbianas, não resistiram e morreram, enquanto que a mesma dose em tubos deu resistência, como se discutiu em 5.1. Há que admitir que em superfície houve outros efeitos deletérios para os microrganismos: dessecação que sofreram as células, bem como ação de quantidade maior de cloro ativo do que nos tubos (onde esse cloro seria mais baixo, por ter havido maior consumo pela matéria orgânica); ainda a ação da atmosfera aeróbia sobre o Clostridium perfringens.

Se assim for, é de crer que doses mais baixas do sanificante também pudessem dar resistência aos microrganismos.

5.4 Ação de C.A.Q. em superfície

O C.A.Q. em superfície também não provocou resistência das células, mas, pela mesma ordem de idéias, talvez doses menores a poderiam provocar.

6 CONCLUSÕES

De acordo com as condições e os resultados de nossa pesquisa, concluimos que:

6.1 Houve resistência de Salmonella typhi e Clostridium perfringens ao uso contínuo do hipoclorito de sódio no experimento realizado em tubos.

6.2 Essa resistência foi comprovada pelo exame dos microrganismos pelo método de GRAM, que denunciou, primeiro, alteração da estrutura microbiana, para, mais tarde, evidenciar estruturas normais quando as bactérias superavam uma fase crítica.

6.3 A contagem microbiana em placas de Petri mostrou ser um método melhor para a avaliação da resistência microbiana que o coeficiente fenólico.

BIBLIOGRAFIA

1. ADAIR, F. W.; GEFFIC, S. J. & GELZER, J. Resistance of Pseudomonas to quaternary ammonium compounds. Appl. Microbiol., 18 (3): 299-302, 1969.
2. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. Standard methods for the examination of water and wastewater. 3.ed. Washington, American Public Health Association, 1971.
3. ANDERSON, M. E.; MARSHALL, R. T.; STRINGER, W. C. & NAU MANN, H. D. Efficacies of three sanitizers under six conditions of application to surfaces of beef. J. Food Sci., 42 (2): 326-329, 1977.
4. ANDERSON, M. E.; MARSHALL, R. T.; STRINGER, W. C. & NAU MANN, H. D. Microbial growth on plate beef during extended storage after washing and sanitizing. J. Food Protec., 42 (5): 389-392, 1979.
5. ANÔNIMO. Dosagem de cloro nos sistemas de tratamento de água das indústrias de alimentos. Ind. Alimentar, 15: 22-26, 1978.
6. ARPAI, J. Nonlethal freezing injury to metabolism and motility of Pseudomonas fluorescens and Escherichia coli. Appl. Microbiol., 10: 297-301, 1962.
7. ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis. 13th. Washington, 1980.

8. AZEVEDO NETO, J. M. de. Desinfetantes principais. Ação bactericida do Cloro. Dioxido de Cloro. Iodo. Ozona. Raios ultra-violeta. In: Secretaria dos Serviços e Obras Públicas. Desinfecção de águas. São Paulo, CE TESB, 1974.
9. BERNARD, M. A.; SNOW, W. B.; OLIVER, V. P. & DAVIDSON, B. Kinetics and mechanism of bacterial disinfection by chlorine dioxide. Appl. Microbiol., 15: 257-265, 1967.
10. BEUCHAT, L. R. & LECHOWICH, R. V. Effect to salt concentration in the recovery medium on heat-injured Streptococcus faecalis. Appl. Microbiol., 16: 772-776, 1968.
11. BLUMKE, R. & MÜLLER, G. Comparative laboratory studies on long-term action of formolin, quaternary ammonium compounds and a combination there of on Leuconostoc dextranicum and Bacillus polymyxa. Lebensmittel-Industr., 26 (3): 107-109, 1979.
12. BOTWRIGHT, W. E. A new germicide for the food industries. J. Milk Technol., 9: 101-106, 1946.
13. BUSTA, F. F. Practical implications of injured microorganisms in food. J. Milk Food Technol., 39 : 138-145, 1976.
14. CAMPER, A. K. & MCFETERS, G. A. Chlorine injury and the enumeration of waterborne coliform bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 37 : 633-641, 1979,
15. CLARCK, C. W. & ORDAL, Z. J. Thermal injury and recovery of Salmonella typhimurium and its effect on enumeration procedures. Appl. Microbiol., 18 (3): 332-336, 1969.

16. CLARCK, C. W.; WITTER, L. D. & ORDAL, Z. J. Thermal injury and recovery of Streptococcus faecalis. Appl. Microbiol., 16: 1764-1769, 1968.
17. COLLINS, E. B.; HSUEH, T. Y. & JOHANSSON, K. R. Congo red as an inhibitor for quaternary ammonium compounds. J. of Dairy Sci., 34: 303-309, 1951.
18. CRISTOVÃO, D. A. Contaminação de alface (Latuca sativa L) por microrganismos de origem fecal: estudo de métodos bacteriológicos para a sua determinação, medida da sua intensidade na cidade de São Paulo. São Paulo, USP/Faculdade de Higiene e Saúde Pública, 1958. (Tese para Catedrático).
19. CROCKER, C. K. Variations in the characteristics of E. coli induced by quaternary ammonium compounds. J. Milk Food Technol., 14: 138-141, 1958.
20. DAVIS, J. G. Chemical sterilization. Progress Industr. Microbiol., 8: 141-206, 1968.
21. DUM, C. G. Mixture of high molecular alkyl dimethylbenzyl ammonium chlorides as an antiseptic. Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 35: 427-429, 1936.
22. DYE, M. & MEAD, G. C. The effect of chlorine on the viability of clostridial spores. J. Food Technol., (7): 173-181, 1978.
23. EDWARDS, J. L.; BUSTA, F. F. & SPECK, M. L. Heat injury of Bacillus subtilis spores at ultrahigh temperatures. Appl. Microbiol., 13: 858-864, 1965.

24. FANSLAU, C. E. Zephyran a new germicide. Vet. Med., 34: 120-121, 1939.
25. FREIBERG, L. Further quantitative studies on the reaction of chlorine with bacteria in water disinfection. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 40: 67-80, 1957.
26. FREIBERG, L. Quantitative studies on the reaction of chlorine with bacteria in water disinfection. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 38: 135-144, 1956.
27. FUNG, D. Y. C. & BOSCH, L. L. V. Repair, growth, and enterotoxigenesis of Staphylococcus aureus S-6 injured by freeze-drying. J. Milk Food Technol., 38 (4): 212-218, 1975.
28. GADNER, J. F. & PHIL, D. Principles of antimicrobial activity. In: Seymour & Black, 2.ed.- Desinfection sterilization and preservation. Philadelphia, Lea & Febiger, 1977.
29. GARVIE, E. I. & CLARKE, P. M. The disinfectant properties of quaternary ammonium compounds and sodium hypochlorite: a comparison of results using different test methods. J. Appl. Bact., 18: 90-106, 1955.
30. GUITERAS, A. F. & SHAPIRO, R. L. A bactericidal detergent for eating utensils. J. Bacteriol., 52: 635-638, 1946.
31. GUTHRIE, R. K. Food sanitation. Westport, Publishing Company Ind. Conn., 1972.
32. HAMILTON, W. A. Membrane active antibacterial compounds. In: HUGO, W. G. - Inhibition and destruction of the microbial cell. London, Academic Press, 1971.

33. HAYS, H.; ELLIKER, P. R. & SANDINE, W. E. Microbial destruction by low concentrations of hypochlorite and iodophor germicides in alkaline and acidified water. Appl. Microbiol., 15: 575-581, 1967.
34. HOBBS, B. C. & GILBERT, R. J. Food poisoning & food hygiene. 4.ed. London, Edward Arnold, 1978.
35. IANDOLO, J. J. & ORDAL, J. Z. Repair of thermal injury of Staphylococcus aureus. J. Bacteriol., 91: 137-142, 1966.
36. ITO, K. A. & SEEGER, M. L. Effects on microorganisms in cooling water. J. Food Protec., 43: 484-487, 1980.
37. JACKSON, H. Loss of viability and metabolic injury of Staphylococcus aureus resulting from storage at 5°C. J. Appl. Bacteriol., 37: 59-64, 1974.
38. JANSSEN, D. W. & BUSTA, F. F. Injury and repair of several Salmonella serotypes after freezing and thawing in milk solids. J. Milk Food Technol., 36: 520-522, 1973.
39. KULIKOVSKY, A.; PANKRATZ, H. S. & SANDOFF, H. J. Ultrastructural and chemical changes in spores of Bacillus cereus after action of disinfectants. J. Appl. Bacteriol., 46: 39-46, 1975.
40. LEGGATT, A. G. The effect upon bacterial survival of sanitizer residues on a soiled surface. J. Milk Food Technol., 33 (4): 121-125, 1970.

41. LEITÃO, M. F. F.; MONTEIRO FILHO, E.; DELAZARI, I. & ANGE LUCCI, E. Eficiência de desinfetantes na redução da contaminação bacteriana da folha de alface (*Lactuca sativa*). B. ITAL, Campinas, 18 (2): 201-226, 1981.
42. LEVINSON, H. S. & HYATT, M. T. Distribution and correlation of events during thermal inactivation of Bacillus megaterium spores. J. Bacteriol., 108: 111-121, 1971.
43. LILARD, H. S. Levels of chlorine and chlorine dioxide of equivalent bactericidal effect on poultry processing water. J. Water Sci., 44: 1594-1597, 1979.
44. MAC LEOD, R. A.; KUD, S. C. & GELINAS, R. Metabolic injury to bacteria. J. Bacteriol., 93 (3): 961-969, 1967.
45. MARSHALL, R. T.; ANDERSON, M. E.; NAUMANN, H. D. & STRINGER, W. C. Experiments in sanitizing beef with sodium hypochlorite. J. Food Protec., 40 (4): 246-249, 1977.
46. MILLER, L. L. & ORDAL, Z. J. Thermal injury and recovery of Bacillus subtilis. Appl. Microbiol., 24 (6): 878-884, 1972.
47. MOOD, E. W. Effect of free and combined available residual chlorine upon bacteria in swimming pools. Amer. J. Public. Health, 40: 273-279, 1978.
48. MOSLEY, E. B.; ELLIKER, P. R. & HAYS, H. Destruction of food spoilage, indicator and pathogenic organisms by various germicides in solution and on stainless steel surface. J. Milk Food Technol., 39 (12): 830-836, 1976.

49. MOSS, C. W. & SPECK, M. L. Identification of nutritional components in trypticase responsible for recovery of Escherichia coli injured by freezing. J. Bacteriol., 91: 1098-1104, 1966.
50. MOSS, C. W. & SPECK, M. L. Injury and death of Streptococcus lactis due to freezing and frozen storage. Appl. Microbiol., 11: 326-329, 1963.
51. NATIONAL CANNERS ASSOCIATION. Alimentos enlatados: principios de controle do processamento térmico e avaliação do fechamento de recipientes. 2.ed. Campinas, ITAL, 1975. (Tradução por Júlio Cesar Medina).
52. NIELSEN, E. W. Effect of hipochlorite and hydrogen peroxide on bacteriophages. In: Internacional Dairy Congress, 20. Stockholm, 1978.
53. ODLAUG, T. E. Antimicrobial activity of halogens. J. Food Protec., 44 (8): 608-613, 1981.
54. ODLAUG, T. E. & PFLUG, I. J. Microbiological and sanitizer analysis of water used for cooling containers of food in comercial canning factories in Minnesota and Wisconsin. J. Food. Sci., 43: 954-963, 1978.
55. PUBLIC HEALTH SERVICE. Ordinance and code regulating eating and drinking establishments. Washington, 1943. (Public Health Bulletin, 28)
56. PARKER, M. E. & LITCHFIELD, J. H. Food plant sanitation. New York, Reinhold, 1962.

57. RAY, B.; JANSSEN, D. W. & BUSTA, F. F. Characterization of the repair of injury induced by freezing Salmonella anatum. Appl. Microbiol., 23 (4): 803-809, 1972.
58. RAY, B.; JEZESKI, J. J. & BUSTA, F. F. Repair of injury in freeze-dried Salmonella anatum. Appl. Microbiol., 22 (3): 401-407, 1971.
59. RAY, B. & SPECK, M. L. Enumeration of Escherichia coli in frozen samples after recovery from injury. Appl. Microbiol., 25 (4): 499-503, 1973.
60. RAY, B. & SPECK, M. L. Metabolic process during the repair of freeze injury in Escherichia coli. Appl. Microbiol., 24 (4): 585-590, 1972.
61. RAY, B. & SPECK, M. L. Repair of injury induced by freezing Escherichia coli as influenced by recovery medium. Appl. Microbiol., 24 (2): 258-263, 1972.
62. ROSSIN, C. R. Desinfecção. In: Técnica de abastecimento e tratamento de água. 2.ed. São Paulo, CETESB, 1979. v.2 p. 883-929.
63. SADOVSKI, A. Y. & FABER, A. Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium in frozen vegetables. Incidence and survival after treatments commonly used at the vegetables freezing plants. J. Food Safety, 2: 59-73, 1980.
64. SCHEUSNER, D. L.; BUSTA, F. F. & SPECK, M. L. Inhibition of injured Escherichia coli by several selective agents. Appl. Microbiol., 21: 46-49, 1971.

65. SCHEUSNER, D. L.; BUSTA, F. F. & SPECK, M. L. Injury of bacteria by sanitizers. Appl. Microbiol., 21 (1):41-45, 1971.
66. SGHEDONI, A. Germicidas clorados e amonia quaternária na prova de redução e diminuição de germes no leite. B.Lei te, 514 (8): 15-17, 1971.
67. SHAHIDI, S. A. & FERGUSON, A. R. New quantitative, qualitative, and confirmatory media for rapid analysis of food for Clostridium perfringens. Appl. Microbiol., 21: 500-506, 1971.
68. SHANNON, E. L.; CLARCK, W. S. & REINBOLD, G. W. Chlorine resistance of enterococci. J. Milk Food Technol., 21: 120-123, 1964.
69. SINSKEY, A. J. & SILVERMAN, G. J. Characterization of injury incurred by Escherichia coli upon freeze-drying. J. Bacteriol., 101: 429-437, 1970.
70. SOGIN, S. J. & ORDAL, Z. J. Regeneration of ribosomes and ribosomal and ribonucleic acid during repair of thermal injury to Staphylococcus aureus. J. Bacteriol., 94 (4): 1082-1087, 1967.
71. SOPREY, P. R. & MAXCY, R. B. Tolerance of bacteria for quaternary ammonium compounds. J. Food Sci., 33: 536 - 540, 1968.
72. SORRELLS, K. M. Pathogenicity of Salmonella gallinarum after metabolic injury by freezing. Appl. Microbiol., (1): 39-43, 1970.

73. SPECK, M. L.; RAY, B. & READ Jr., R. B. Repair and enumeration of injured coliforms by a plating procedure. Appl. Microbiol., 29 (4): 549-550, 1975.
74. STRAKA, R. P. & STOKES, J. L. Metabolic injury to bacteria at low temperatures. J. Bacteriol., 78: 1082-1087, 1959.
75. TILLEY, F. W. & CHAPIN, R. M. Germicidal efficiency of chlorine and the N-chloro derivatives of ammonia, methylamine and glycine against anthrax spores. J. Bacteriol., 19 (5): 295-302, 1930.
76. TOMLINS, R. I.; PIERSON, M. D. & ORDAL, Z. J. Effect of thermal injury on the TCA cycle enzymes of Staphylococcus aureus MF 31 and Salmonella typhimurium 7136. Canadian J. Microbiol., 17: 759-765, 1971.
77. TOMLINS, R. I. & ORDAL, Z. J. Precursor ribosomal ribonucleic acid and ribosome accumulation in vivo during the recovery of Salmonella typhimurium from thermal injury. J. Bacteriol., 107: 134-142, 1971.
78. TOMLINS, R. I. & ORDAL, Z. J. Requirements of Salmonella typhimurium for recovery from thermal injury. J. Bacteriol., 105: 512-518, 1971.
79. TOMLINS, R. I.; VAALER, G. L. & ORDAL, Z. J. Lipid biosynthesis during the recovery of Salmonella typhimurium from thermal injury. Can. J. Microbiol., 18: 1015-1021, 1972.

80. VERRIPS, C. T. & KWAST, R. H. Recovery of heat-injured Citrobacter freundii cells. J. Appl. Bacteriol., 52:15-20, 1982.
81. WASHAM, C. J.; SANDINE, W. E. & ELLIKER, P. R. A strain of Pseudomonas aeruginosa resistant to a quaternary ammonium compound. J. Milk Food Technol., 39 (2): 101-106, 1976.
82. WASHAM, C. J. A strain of Pseudomonas aeruginosa resistant to a quaternary ammonium compound. J. Milk Food Technol., 39 (4): 273-279, 1976.
83. WASHAM, C. J.; SANDINE, & ELLIKER, P. R. A strain of Pseudomonas aeruginosa resistant to a quaternary Ammonium compound. J. Milk Food Technol., 39 (8): 546-550, 1976.
84. WEBER, G. R. & BLACK, L. A. Quaternary inhibitors: relative efficiency. Soap. San. Chem., 24: 134-137, 1948.
85. WYATT, L. & WAITES, W. The effect of hypochlorite on the germination of spores of Clostridium bifermentans. J. Gen. Microbiol., 78 : 383-386, 1973.