

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA SANIFICANTE
DO HIPOCLORITO DE SÓDIO PELO USO DE
ESPOROS DE Bacillus subtilis ATCC 19659

Nélio José de Andrade

ORIENTADOR

Prof. Dr. Antônio de Melo Serrano

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do grau de
Doutor em Tecnologia de Alimentos.

Parecer

Este exemplar corresponde a uma cópia final da tese defendida por
Nélio José de Andrade e apro-
vada pela Comissão Julgadora
em 06.07.89.

Campinas, 06 de julho de 1989



Presidente da Banca

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos meus pais, Hêlio e Nair

À minha esposa, Maria Eliza

As minhas filhas, Priscila e Patricia

Dedico este trabalho!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, ao Departamento de Tecnologia de Alimentos e à Universidade Estadual de Campinas, por tornarem possível a realização deste Curso de Doutorado;

Ao Prof. Dr. Antônio de Melo Serrano pela confiança, compreensão, amizade e orientação segura durante todas as etapas do Curso;

À Profa. Dra. Maria Amélia Chaib Moraes pelo apoio que me deu;

À Profa. Dra. Eugênia Maria R. Charnet pelo auxílio nas análises estatísticas dos resultados;

Às Profas. Magdala Alencar Teixeira e Maria Elilce L. Hartyn que assumiram a responsabilidade de minhas funções junto ao DTA-UFV;

Ao amigo Cláudio pela ajuda inestimável na resolução de assuntos particulares;

Aos amigos Ana Maria Silva, Benjamin de Almeida Mendes, Celso Roberto Dias Bueno, Francisco C. Rebouças, José Benício P. Chaves, José de Assis F. Faria, Maria Cristina A. V. Mosquim, Maria José dos Santos, Maria Tereza Destro, Paulo César Stringheta, Paulo Roberto Mosquim e Valéria C. Amstalden Junqueira, pelo apoio e colaboração em diversas etapas do Curso;

Ao PICD-CAPES pela bolsa de estudos concedida;

A Associação Brasileira de Indústrias de Alimentação (ABIA) pelo suporte financeiro para as cópias xerográficas desta tese;

A todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Tecnologia de Alimentos e do Departamento de Ciências de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp;

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

Muito Obrigado!!

ÍNDICE

PÁGINA

RESUMO.....	vi
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. OS COMPOSTOS CLORADOS E SUAS APLICAÇÕES NA INDÚS- TRIA DE ALIMENTOS.....	3
2.1.1. OS COMPOSTOS CLORADOS.....	3
2.1.2. AS APLICAÇÕES DOS COMPOSTOS CLORADOS.....	8
2.1.2.1. A cloração da água de resfriamento de produtos enlatados esterilizados.....	11
2.1.2.2. A cloração da água para sanificação de super- fícies (pisos, paredes, utensílios e equipa- mentos).....	13

2.1.2.3. A cloração da água para redução da carga microbiana das superfícies de alimentos.....	14
2.2. O <u>ESPORO BACTERIANO</u>	16
2.2.1. RESISTÊNCIA DOS ESPOROS AOS AGENTES QUÍMICOS....	21
2.2.2. CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DOS ESPOROS À AÇÃO DOS AGENTES FÍSICOS E QUÍMICOS.....	27
2.2.3. O ESPORO COMO INDICADOR DA EFICIÊNCIA DOS TRATAMENTOS ESPORICIDAS.....	29
2.2.4. ESTABILIDADE DO NÚMERO DE ESPOROS E DE SUA RESISTÊNCIA AOS AGENTES FÍSICOS E QUÍMICOS DURANTE O ARMAZENAMENTO.....	30
2.2.5. MECANISMO DA AÇÃO ESPORICIDA DOS COMPOSTOS CLORADOS.....	32
2.3. <u>AVALIAÇÃO DE SANIFICANTES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS</u>	35
2.3.1. TESTE DO COEFICIENTE FENÓLICO.....	36
2.3.2. TESTE DA DILUIÇÃO DE USO.....	38

2.3.3. TESTE DE CAPACIDADE.....	39
2.3.4. TESTE DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GERMI- CIDA EQUIVALENTE AO CLORO DISPONÍVEL.....	40
2.3.5. TESTE DE SUSPENSÃO.....	40
2.3.6. TESTE ESPORICIDA.....	41
2.3.7. TESTE EM USO.....	42
2.3.8. TESTE EM USO SIMULADO.....	43
 3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	 46
3.1. <u>MATERIAIS</u>	46
3.1.1. SOLUÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO.....	46
3.1.2. LOTES DE ESPOROS DE <u>Bacillus subtilis</u> ATCC 19659.....	46
3.1.3. EQUIPAMENTOS DE LABORATÓRIO.....	48
3.2. <u>MÉTODOS</u>	49

3.2.1. REDUÇÕES DO NÚMERO DE ESPOROS DE <u>B. subtilis</u> DURANTE A AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO.....	49
3.2.2. REDUÇÕES DO NÚMERO DE ESPOROS DE <u>B. subtilis</u> DURANTE O ARMAZENAMENTO QUANDO SUBMETIDOS À AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO.....	50
3.2.3. REDUÇÕES DO NÚMERO DE ESPOROS DE <u>B. subtilis</u> QUANDO SUBMETIDOS À SOLUÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E VALORES DE pH.....	51
3.2.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	52
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54
4.1. AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO SOBRE OS ESPOROS DE <u>B. subtilis</u>	54
4.2. ESTABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO DO NÚMERO DE ESPOROS DE <u>B. subtilis</u> E DE SUA RESISTÊNCIA AO HIPOCLORITO DE SÓDIO.....	67

4.3. EFEITOS DAS VARIAÇÕES DA CONCENTRAÇÃO E DO PH DAS SOLUÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO SOBRE OS ESPOROS DE <u>B. subtilis</u>	82
5. CONCLUSÕES.....	106
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
7. APÊNDICE.....	127

RESUMO

A eficiência de soluções de hipoclorito de sódio foi avaliada usando-se como indicadores os esporos de B. subtilis ATCC 19659.

Foram produzidos, em tempos diferentes, dez lotes de esporos de B. subtilis ATCC 19659 com mesma resistência ao hipoclorito, pois não houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$) nas reduções decimais do número desses esporos após serem submetidos a 105 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 a 30°C.

A estabilidade do número de esporos de B. subtilis ATCC 19659 e de sua resistência às soluções de hipoclorito de sódio com 105 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 no tempo de contato de 145 minutos a 30°C foi avaliada aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias em três armazenamentos: refrigeração a 4°C, congelamento a -18°C, ambos em glicerol e água (15 : 85) e liofilização em tampão fosfato M/15 de pH 7 com posterior estocagem a 4°C. A refrigeração, de acordo com as análises estatísticas, foi a melhor forma de armazenamento: o número dos esporos permaneceu constante durante os 180 dias, numa faixa de 1,41 a 1,58 x 10⁹ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) e a resistência ficou estável por 150 dias, mantendo-se entre 2,62 e 2,69 reduções decimais (RD). No congelamento detectou-se uma tendência de aumento do número de esporos viáveis à medida que se prolongou a armazenagem. A resistência permaneceu

estável por 120 dias, entre 2,65 e 2,72 RL. Sob liofilização, verificou-se uma maior variação no número de esporos viáveis nos diversos períodos de armazenamento. A resistência ao cloro manteve-se a mesma por 90 dias, entre 2,63 e 2,98 RL.

A ação esporicida das soluções de hipoclorito de sódio contendo 50, 75, 105, 150 e 200 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 e 105 mg/l com pH 9,0, 8,0 e 7,0, à temperatura de 30°C foi avaliada em lotes de esporos de *E. subtilis* ATCC 19659 suspensos em glicerol e água (15 : 85). Os tempos de contato, para cada condição, foram escolhidos dentro da faixa de morte acentuada, em ensaios preliminares. A partir das reduções decimais do número dos esporos, chegou-se a equações de regressão linear do tipo $Y = aX + b$, onde Y representa as reduções decimais e X os tempos de contato do sanificante com os esporos. O tempo de início de morte (tempo necessário a completar-se a fase lag) e o valor D puderam, então, ser determinados a partir das equações, apresentando nítidas diferenças entre si.

Os resultados experimentais permitiram o desenvolvimento da seguinte equação:

$$T = \text{antilog} \left[-1,0945 \log \left(\frac{\text{mg/l cloro disponível livre}}{1 + 10^{\text{pH} - 7,50}} \right) + 1,5106 \right]$$

+

$$a \left(\text{antilog} \left[-0,8869 \log \left(\frac{\text{mg/l cloro disponível livre}}{1 + 10^{\text{pH} - 7,50}} \right) + 1,1401 \right] \right)$$

Esta equação determina o tempo de contato (T), em minutos, das soluções de hipoclorito de sódio com os esporos de B. subtilis ATCC 19659 necessário para uma determinada redução decimal (a) do número desses esporos, conhecendo-se a concentração em cloro disponível livre em mg/l e os valores do pH das soluções.

SUMMARY

The efficiency of sodium hypochlorite as a sporicide was studied using Bacillus subtilis ATCC 19659. Ten lots of spores, produced on different occasions, showed no significant difference ($P < 0.05$) in resistance to 105 mg/l free available chlorine at pH 9.8 and 30°C, measured as decimal reduction in the number of spores.

Spores were stored under three different conditions: at 4°C and at -18°C in glycerol: H₂O (15 : 85), and at 4°C lyophilized in 0.067 M phosphate buffer at pH 7.0. The stability of the spore population and its resistance to NaOCl (105 mg/l free available chlorine) at pH 9.8 for 145 min at 30°C was determined every 30 d for up to 180 d. At 4°C, no change occurred in the spore population for 180 d, maintaining a range of 1.41 to 1.58 x 10⁹ colony forming units per ml (CFU/ml), and no change in resistance occurred for 150 d, remaining between 2.62 and 2.69 decimal reduction (DR). At -18°C, the number of viable spores tended to increase and resistance was stable for 120 d, between 2.65 and 2.72 DR. Under lyophilization the number of viable spores was variable. Resistance to chlorine remained the same for 90 d, between 2.63 and 2.98 DR.

The sporicidal action of NaOCl at 50, 75, 105, 150 and 200 mg/l of free available chlorine at pH 9.8, and 105 mg/l at pH 7.0, 8.0 and 9.0, was studied using lots of spores suspended in solutions of glycerol: H₂O (15 : 85) at 30°C. The times of contact were chosen from a death range in preliminary

studies. The decimal reductions could be expressed by the linear regression equation $Y = aX + b$, where Y = decimal reduction and X = time of contact of the sanitizing agent with the spores. The time of initiation of death, i.e., the necessary time to complete the lag phase, and the D value could thus be determined.

From the experimental results, the following equation was developed to determine the time of contact of, in min, the NaOCl solution with the spores (T) necessary to determine the decimal reduction (a) of the number of spores at given concentration of free available chlorine, in mg/l , and pH :

$$T = \text{antilog} [-1.0945 \log \left(\frac{\text{mg/l free available chlorine}}{1 + 10^{\text{pH} - 7.50}} \right) + 1.5106]$$

+

$$a \{ \text{antilog} [-0.8869 \log \left(\frac{\text{mg/l free available chlorine}}{1 + 10^{\text{pH} - 7.50}} \right) + 1.1401] \}$$

1. INTRODUÇÃO

O uso de sanificantes é importante dentro de um programa de higienização numa indústria de alimentos que objetive colocar à disposição do consumidor produtos com boas condições higiênico-sanitárias.

Dentre os produtos químicos usados na sanificação, encontram-se os diversos compostos clorados representados por um grande número de marcas comerciais. Estes produtos se caracterizam por apresentarem níveis de eficiência variáveis, em virtude das diferentes formulações, valores de pH, resíduos contaminantes, tipos de embalagem, condições de armazenamento, entre outros fatores. Considerando-se que o sanificante é o principal responsável pela eliminação a níveis seguros de microrganismos das superfícies de pisos, de paredes e principalmente de utensílios e de equipamentos que entram em contato com alimentos, é necessário que a indústria disponha de técnicas microbiológicas apropriadas para uma avaliação microbicida desses agentes químicos.

Entre os testes microbiológicos disponíveis para avaliação dos sanificantes, encontra-se o teste de suspensão recomendado pela "Association of Official Analytical Chemists (AOAC)" cuja metodologia simples permite fazerem-se simulações próximas às condições práticas de uso na indústria de alimentos.

O teste de suspensão, porém, não diferencia a eficiência de soluções cloradas mais fortes recomendadas para a sanificação. Assim, quaisquer das concentrações entre 50 e 200

mg/l de cloro disponível, com pH variando entre 7 e 11, atingem facilmente o índice de 5 reduções do número de Staphylococcus aureus ATCC 6538 e Escherichia coli ATCC 11229 nos 30 segundos preconizados pelo método.

A falta de respostas diferenciadas deste teste para concentrações elevadas de cloro levou-nos ao uso de esporos de Bacillus subtilis ATCC 19659, escolhidos em ensaios preliminares, para substituírem as células vegetativas.

Os esporos apresentam características e propriedades específicas que tornaram necessários experimentos visando utilizá-los na avaliação sanitizante do hipoclorito de sódio.

Assim, estudou-se a possibilidade de se produzirem, em tempos diferentes, lotes desses esporos com mesma resistência ao agente químico. Também, a estabilidade do número de esporos e de sua resistência ao cloro durante o armazenamento foi avaliada, por ser uma característica que permite armazená-los por períodos de tempo prolongados. Ainda, foram estudados os efeitos da variação da concentração e dos valores de pH das soluções cloradas sobre os esporos. Os resultados experimentais permitiram o desenvolvimento de uma equação matemática que determina o tempo de início de morte e o valor D, usados para se avaliar a resistência dos esporos e, também, estima o tempo de contato com o cloro necessário para se obter uma determinada redução do número de esporos conhecendo-se a concentração de cloro disponível livre e o pH das soluções.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. OS COMPOSTOS CLORADOS E SUAS APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

2.1.1. OS COMPOSTOS CLORADOS

O Quadro 1, adaptado de DYCHDALA (1977), relaciona os principais compostos clorados inorgânicos e orgânicos disponíveis para as indústrias de alimentos.

Os hipocloritos, cujas vantagens e desvantagens estão mostradas no Quadro 2, são amplamente utilizados. Dentre eles, o hipoclorito de sódio, comercializado sob a forma líquida em teores de 1 a 15% de cloro disponível, é o mais usado. Os hipocloritos de cálcio e lítio contêm, respectivamente, cerca de 70 e 35% de cloro disponível e são comercializados nas formas em pó ou granulada. Já o fosfato triclorado de sódio, também comercializado na forma de pó, apresenta ações de detergência, mas contém cerca de 3,5% de cloro disponível, o que lhe confere, ainda, uma ação bactericida (TRUEMAN, 1971; TAMPLIN, 1980; BANWART, 1981).

Por outro lado, o gás cloro é de difícil manuseio, exigindo para o seu uso equipamentos especiais e pessoal bem treinado. Ele é comercializado na forma líquida, em cilindros de aço, onde se encontra comprimido. Do estado líquido, forma em que é 1,5 vezes mais denso que a água, o cloro reverte-se à forma gasosa quando liberado em condições atmosféricas e, em solução

QUADRO 1 - Relação dos principais compostos clorados inorgânicos e orgânicos.

Compostos clorados		% de cloro disponível
Inorgânicos		
- Hipoclorito de sódio		1 - 15
- Hipoclorito de cálcio		70 - 72
- Hipoclorito de lítio		30 - 35
- Fosfato triclorado de sódio		3,5
- Gás cloro		100
- Dióxido de cloro		17
Orgânicos		
- Cloramina T		24 - 26
- Dicloramina T		56 - 60
- Diclorodimetil hidantoína		66
- Ácido tricloroisocianúrico		89 - 90
- Ácido dicloroisocianúrico*		70

* Disponíveis também as formas de sais de sódio e potássio.

Fonte: Dychdala, 1977.

QUADRO 2 - Vantagens e desvantagens dos hipocloritos como
sanificantes.

=====	
Vantagens	Desvantagens
=====	
- Relativamente baratos	- Instáveis ao armazenamento
- Agem rapidamente	- Inativados pela matéria orgânica
- Não afetados pela dureza da água	- Corrosivos quando não usados corretamente
- Efetivos contra uma grande variedade de microrganismos inclusive esporos e bacteriófagos	- Irritantes para a pele
- Efetivos em baixas concentrações	- Podem provocar odores indesejáveis
- Relativamente não tóxicos nas condições de uso	- Precipitam em água contendo ferro
- Não mancham equipamentos	- Menor eficiência com aumento do pH da solução
- Fáceis de preparar e aplicar	- Removem carbono da borracha de equipamentos
- Concentrações facilmente determinadas	
- Podem ser usados em tratamento de água	

=====

Fonte: Banwart, 1981.

aquosa se hidrolisa originando o ácido hipocloroso que apresenta ação germicida. O gás cloro, assim como os demais compostos clorados, tem a capacidade de deslocar o iodo e o bromo de seus respectivos sais por metátese. Este mecanismo é empregado na prática para a formulação de misturas desses halogênios (DYCHDALA, 1977).

Já o dióxido de cloro tem sido largamente pesquisado para a cloração da água usada na indústria de alimentos (LILARD, 1980; COSTILOW et alii, 1984; EMSWILER-ROSE & KOTULA, 1984; FOEGEDING et alii, 1986). Comparado aos demais compostos clorados inorgânicos, o uso do dióxido de cloro como bactericida apresenta algumas vantagens. Ele é mais estável em soluções aquosas e por isso sua ação sobre os microrganismos se mantém por mais tempo. Hidrolisa compostos fenólicos, diminuindo a possibilidade de sabores e odores indesejáveis na água (ITO & SEEGER, 1980). Além disso, esse composto reage com menos intensidade com a matéria orgânica e, como consequência, forma quantidades menores de trihalometanos, compostos clorados orgânicos considerados carcinogênicos (NOSS & OLIVIERI, 1985; WEI et alii, 1985), cujos teores máximos permitidos pela legislação americana são de $100 \mu\text{g/l}$ de água (WARD et alii, 1984).

Por outro lado, embora seja cerca de 2,5 vezes mais oxidante do que o ácido hipocloroso (BERNARDE et alii, 1967) e apresentar boa ação esporicida (FOEGEDING et alii, 1986), o dióxido de cloro tem problemas de manuseio e estocagem, o que limita o seu uso (APHA, 1976). Ele é, muitas vezes, produzido no local de aplicação pela reação do clorito de sódio com o gás

cloro (LILARD, 1980) ou com ácidos, sendo volátil e explosivo em determinadas condições. Entretanto, soluções aquosas estáveis do dióxido de cloro têm sido comercializadas (DYCHDALA, 1977; HARAKEH et alii, 1988).

Os compostos clorados orgânicos, ou seja, as cloraminas orgânicas são produtos de reações do ácido hipocloroso com aminas, iminas, amidas e inidas (DYCHDALA, 1977; ODLAUG, 1981). Dentre as cloraminas orgânicas destacam-se a cloramina T, a dicloramina T, a diclorodimetil hidantoína, o ácido tricloroisocianúrico e o ácido dicloroisocianúrico e seus sais de sódio e potássio.

Estes produtos, que apresentam teores de cloro disponível entre 24 e 90% (Quadro 1), geralmente são comercializados na forma de pó e apresentam uma melhor estabilidade ao armazenamento do que os compostos clorados inorgânicos (DYCHDALA, 1977). Também são mais estáveis em solução aquosa, o que implica numa liberação mais lenta de ácido hipocloroso e conseqüentemente permanecem efetivos por períodos de tempo maiores. Por outro lado, sendo menos reativas com a matéria orgânica, as cloraminas formam trihalometanos em níveis inferiores aos compostos clorados inorgânicos.

Um composto clorado orgânico que tem sido muito avaliado nos últimos anos é o 3-3-cloro-dimetil-oxazolidinona, mais conhecido como agente I. Este produto apresenta características semelhantes às demais cloraminas orgânicas (WILLIAMS et alii, 1985; ELDER et alii, 1987).

2.1.2. AS APLICAÇÕES DOS COMPOSTOS CLORADOS

O cloro foi descoberto como elemento químico em 1808 por sir Humprey Davy e teve suas propriedades bactericidas demonstradas, sob condições de laboratório, pelo bacteriologista alemão KOCH em 1881 (WEI et alii, 1985). Em 1886, a "American Public Health Association" aprovou o uso dos hipocloritos como desinfetantes e no início do presente século algumas regiões dos Estados Unidos da América usavam estes agentes químicos na purificação da água para consumo da população (MERCER & SOMNERS, 1957; DYCHDALA, 1977).

As indústrias de alimentos rapidamente aderiram ao uso do cloro para melhorar a qualidade da água que utilizavam e também na sanificação de pisos, paredes, utensílios e equipamentos. Assim, em 1939, quando o "United States Milk Ordinance and Code" recomendou o cloro como um dos agentes disponíveis para a sanificação de equipamentos, seu uso era já uma prática amplamente difundida (WEI et alii, 1985).

Ao longo do tempo o uso do cloro na indústria de alimentos evoluiu e atualmente tem outras aplicações. Assim, concentrações de cloro acima daquelas utilizadas no tratamento convencional da água para consumo humano são recomendadas para a água de processamento de alimentos (4 - 8 mg/l de cloro disponível), a de limpeza em geral (20 - 25 mg/l) e a de resfriamento de produtos enlatados esterilizados (5 mg/l). Uma outra aplicação das soluções cloradas é na redução microbiana das superfícies de

vários alimentos. Nesse caso, a concentração de cloro varia com o produto alimentício.

A cloração acima do ponto-de-quebra da água usada na indústria de alimentos é uma importante técnica desenvolvida entre 1940 e 1950 (SOMMERS, 1951) e consiste basicamente na adição de cloro suficiente para reagir com ions inorgânicos presentes, oxidar completamente as cloraminas formadas pela reação do cloro com substâncias orgânicas e ainda permitir um residual de cloro.

A Figura 1 mostra esquematicamente o ponto-de-quebra. Até esse ponto parte do cloro adicionado atende à demanda: reage com ions inorgânicos, forma cloraminas com substâncias orgânicas e em seguida oxida essas cloraminas o que provoca uma diminuição no cloro residual livre. No ponto-de-quebra a água já não apresenta mais sabores e odores indesejáveis, pois as substâncias que causam este problema foram oxidadas. Acima do ponto-de-quebra o cloro residual livre é proporcional ao que se for adicionando.

A cloração acima do ponto-de-quebra, além de eliminar odores indesejáveis na água, trouxe inúmeros benefícios à indústria de alimentos. São válidas ainda hoje as observações da pesquisa de SOMMERS em 1951 sobre a cloração da água em quatro indústrias americanas. Usando concentrações de cloro disponível livre entre 2 e 10 mg/l durante as operações de processamento e 20 mg/l no procedimento de limpeza, constatou que o uso contínuo do cloro previniu ou reduziu o acúmulo de limosidades microbianas

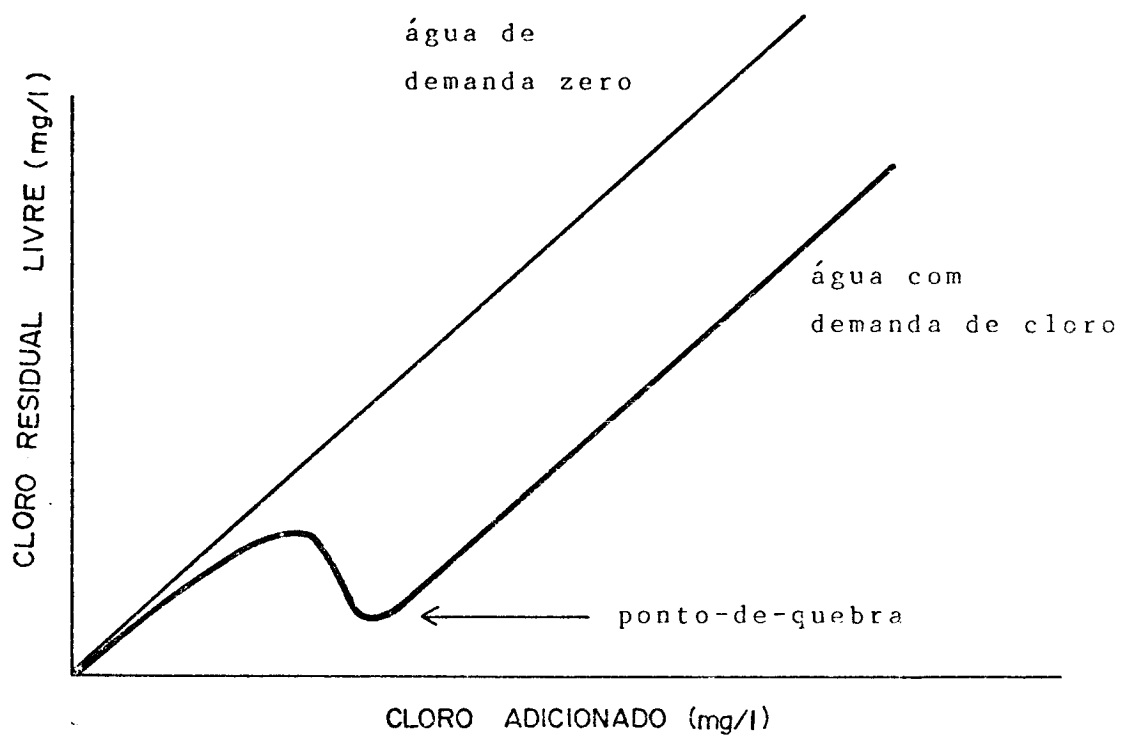


FIGURA 1 - Adição de cloro à água.

nas superfícies dos equipamentos, utensílios, pisos e paredes e também eliminou o desenvolvimento de odores indesejáveis. O uso da água clorada diminuiu o tempo destinado à limpeza das indústrias e reduziu a contagem microbiana dos produtos acabados.

2.1.2.1. A cloração da água de resfriamento de produtos enlatados esterilizados

Uma importante aplicação do cloro na indústria de alimentos é na água de resfriamento de produtos enlatados esterilizados. Estes produtos são rapidamente resfriados à temperatura ambiente, após a esterilização, com o objetivo de evitar a permanência prolongada em temperaturas que favoreçam o desenvolvimento de bactérias, principalmente de termófilas. Entretanto, o resfriamento provoca um vácuo interno na lata e, se houver falhas no seu fechamento, pode ocorrer a entrada de água. Por isso, a água de resfriamento deve ser de boa qualidade bacteriológica para evitar possíveis recontaminações dos produtos.

As concentrações de cloro disponível na água de resfriamento podem atingir 5 mg/l e normalmente são capazes de diminuir a contagem de mesófilos, a incidência de coliformes e eliminar os patógenos (PUT et alii, 1972; GRAVES et alii, 1977; ODLAUG & PFLUG, 1978; ITO & SEEGER, 1980; STALKER & THORPE, 1984; LAKE et alii, 1985).

O problema de recontaminação pela água de resfriamento é minimizado quando a contagem total de mesófilos se mantém abaixo de 1×10^2 UFC/ml (PUT et alii, 1972). Entretanto, contagens médias superiores a este nível têm sido encontradas nas

águas de diversas indústrias enlatadoras. Isso foi demonstrado numa pesquisa na água de resfriamento de 30 indústrias americanas, que revelou uma contagem média de aeróbios mesófilos de $3,4 \times 10^2$ UFC/ml (GRAVES et alii, 1977). Resultados mais expressivos foram detectados em uma outra pesquisa que constatou a presença de $1,9 \times 10^4$ UFC/ml de esporos aeróbios na água de resfriamento de uma indústria (LAKE et alii, 1985).

Há necessidade de se fazer uma cloração correta da água de resfriamento nas indústrias alimentícias, pois já está comprovada a relação entre as concentrações de cloro disponível e as contagens microbianas. Isto foi verificado, por exemplo, em indústrias enlatadoras que usavam 3 mg/l, entre 1 e 3 e menos de 1 mg/l de cloro disponível, nas quais o número de amostras de águas que apresentavam contagens de mesófilos superiores a 1×10^2 UFC/ml era, respectivamente, 14, 50 e 68% (GRAVES et alii, 1977). Verificaram-se resultados semelhantes na água de resfriamento de outra indústria: em concentrações de 5 mg/l de cloro disponível as contagens de esporos aeróbios eram $2,4 \times 10^2$ UFC/ml; em concentrações inferiores a 1 mg/l as contagens atingiam $1,9 \times 10^4$ UFC/ml (LAKE et alii, 1985).

Existe um consenso entre os pesquisadores de que a presença de esporos predomina na água de resfriamento corretamente clorada. Além disso, as contagens de esporos aeróbios são geralmente superiores às de anaeróbios (PUT et alii, 1972; ODLAUG & PFLUG, 1978; LAKE et alii, 1985). Algumas pesquisas não detectaram a presença de Clostridium botulinum na água de resfriamento de várias indústrias enlatadoras (GRAVES et alii, 1977; LAKE et

alii, 1985). Um outro trabalho revelou que numa indústria avaliada a recontaminação de uma lata com C. botulinum através da água de resfriamento apresentava uma probabilidade entre $2,0 \times 10^{-6}$ e $2,7 \times 10^{-7}$ (ODLAUG & PFLUG, 1978).

2.1.2.2. A cloração da água para a sanificação de superfícies (pisos, paredes, utensílios e equipamentos)

Uma outra função extremamente importante do cloro é o seu emprego como sanificante nos procedimentos de higienização adotados na indústria de alimentos. A sanificação visa eliminar as formas vegetativas dos microrganismos patogênicos e reduzir, até níveis seguros, os não patogênicos de utensílios e de equipamentos que entram em contato com alimentos, entre outras superfícies.

Na sanificação, as concentrações de cloro disponível das soluções são bem mais elevadas do que em outras aplicações dos compostos clorados. Recomenda-se, geralmente, uma concentração de 100 mg/l de cloro disponível livre quando a sanificação é efetuada por imersão ou circulação e 200 mg/l quando o processo é aspersão ou nebulização com um tempo de contato do cloro de até 15 ou 20 minutos (LEITAO, 1976; LEWIS, 1980; BANWART, 1981; FOEGEDING, 1983; BRASIL, 1984; LOPES, 1986). Quando se usam compostos clorados orgânicos, por apresentarem ação mais lenta, sugere-se que essas concentrações sejam aumentadas (FOEGEDING, 1983). Entretanto, existe uma recomendação do Departamento de Saúde e Bem-estar dos Estados Unidos da América para que as concentrações das soluções sanificantes usadas em

superfícies que entram em contato com alimentos não ultrapassem 200 mg/l de cloro disponível (LEWIS, 1980; WEI et alii, 1985).

Na sanificação, o uso de soluções cloradas mais concentradas, dentro dos limites expostos, se faz necessário, pois existe a possibilidade de nas etapas anteriores da higienização não se terem removido completamente os resíduos orgânicos das superfícies, os quais reagem e inativam rapidamente o cloro. Por outro lado, concentrações mais elevadas de cloro disponível podem agir com mais eficiência sobre os esporos bacterianos que contaminam as superfícies. Outros fatores que melhoram a eficiência dos sanificantes clorados são o aumento da temperatura, do tempo de contato e a diminuição do pH (LEITÃO, 1976; FOEGEDING, 1983). Entretanto, abusos em quaisquer desses parâmetros podem ocasionar problemas de corrosão nas superfícies sanificadas, mesmo que sejam de aço inoxidável (BAHWART, 1981).

2.1.2.3. A cloração da água para a redução da carga microbiana das superfícies de alimentos

Outra aplicação das soluções cloradas é na redução da carga microbiana das superfícies de matérias primas alimentares. Na literatura, encontram-se relatos do uso de soluções cloradas nas superfícies de camarão (PYLE & KOBURGER, 1984), de frango (LILARD, 1980; KRAFT et alii, 1982), de carnes (JONSHON et alii, 1979), de pepino (COSTILOW et alii, 1984), de alface (LEITÃO et alii, 1981) e de ovos (LEITÃO, 1986).

Uma redução de 75% na carga microbiana em camarões foi constatada após o uso de solução com 200 mg/l de cloro

disponível, a pH 7,0 e tempo de contato de 15 minutos (PYLE & KOBURGER, 1984). Os autores consideram que a redução não foi maior porque os microrganismos nos camarões poderiam estar em locais de difícil acesso ao cloro.

Foi constatada também uma redução de mesófilos aeróbios e de coliformes nas superfícies de frangos após serem imersos rapidamente em soluções com 20 mg/l de cloro disponível. Apesar disso, a vida de prateleira dos produtos não aumentou (KRAFT et alii, 1982).

Por outro lado, as reduções das cargas bacterianas nas superfícies de alfaces não foram em níveis considerados seguros após contato com 50, 100 e 200 mg/l de cloro disponível livre nos tempos de contato de 1, 2, 5, 10, 20 e 30 minutos (LEITAO et alii, 1984).

No entanto, a eliminação de patógenos como salmonelas e o Staphylococcus aureus das superfícies de ovos usados em massas alimentícias pode ser obtida através da aplicação da solução clorada com 100 mg/l de cloro disponível livre num tempo de contato não inferior a 30 segundos (LEITAO, 1986).

O sucesso do uso das soluções cloradas sobre as superfícies dos alimentos depende da escolha correta do sanificante, da concentração a usar e do tipo de flora contaminante, entre outros fatores. Isso foi mostrado numa pesquisa em que 18 culturas puras e duas culturas mistas de microrganismos potencialmente patogênicos associados com produtos cárneos e de aves foram submetidos às soluções de hipoclorito de sódio em

pH 6,25 e de dióxido de cloro em pH 3,0 nas concentrações de 50, 100, 200, 400, 800, 1600 e 3200 mg/l de cloro disponível livre. Além da maior eficiência nas concentrações mais elevadas, os resultados revelaram que o hipoclorito foi mais eficiente contra as bactérias gram-negativas, enquanto o dióxido de cloro atuou melhor sobre as gram-positivas (EKSWILER-ROSE, 1984).

2.2. O ESPORO BACTERIANO

O esporo bacteriano é uma formação intracelular que ocorre em seis gêneros de microrganismos - Bacillus, Clostridium, Sporolactobacillus, Desulfotomaculum, Sporosarcina e Oscillospira - abrangendo cerca de 115 espécies que têm a capacidade genética de apresentarem essa forma de resistência em condições adversas (YILDIZ, 1978; DOORES, 1983; SNEATH, 1986).

Os esporos bacterianos apresentam especial interesse e importância para a indústria de alimentos por serem muito resistentes ao calor (GOULD, 1977; ANAGNOSTOPOULOS & SHIDU, 1981; GOMBAS, 1983), aos agentes químicos (BLOCHER & BUSTA, 1983; COOK & PIERSON, 1983; FOEGEDING, 1983; STEVENSON & SHAFER, 1983), à irradiação, à dessecação, ao vácuo, ao congelamento, etc (YILDIZ, 1978).

Há uma sequência de mudanças morfológicas semelhantes em todas as espécies que esporulam. Apesar de ser um processo contínuo, a esporulação é separada didaticamente em vários estágios, para melhor compreensão. A seguir é representado esquematicamente o processo de esporulação (Figura 2).

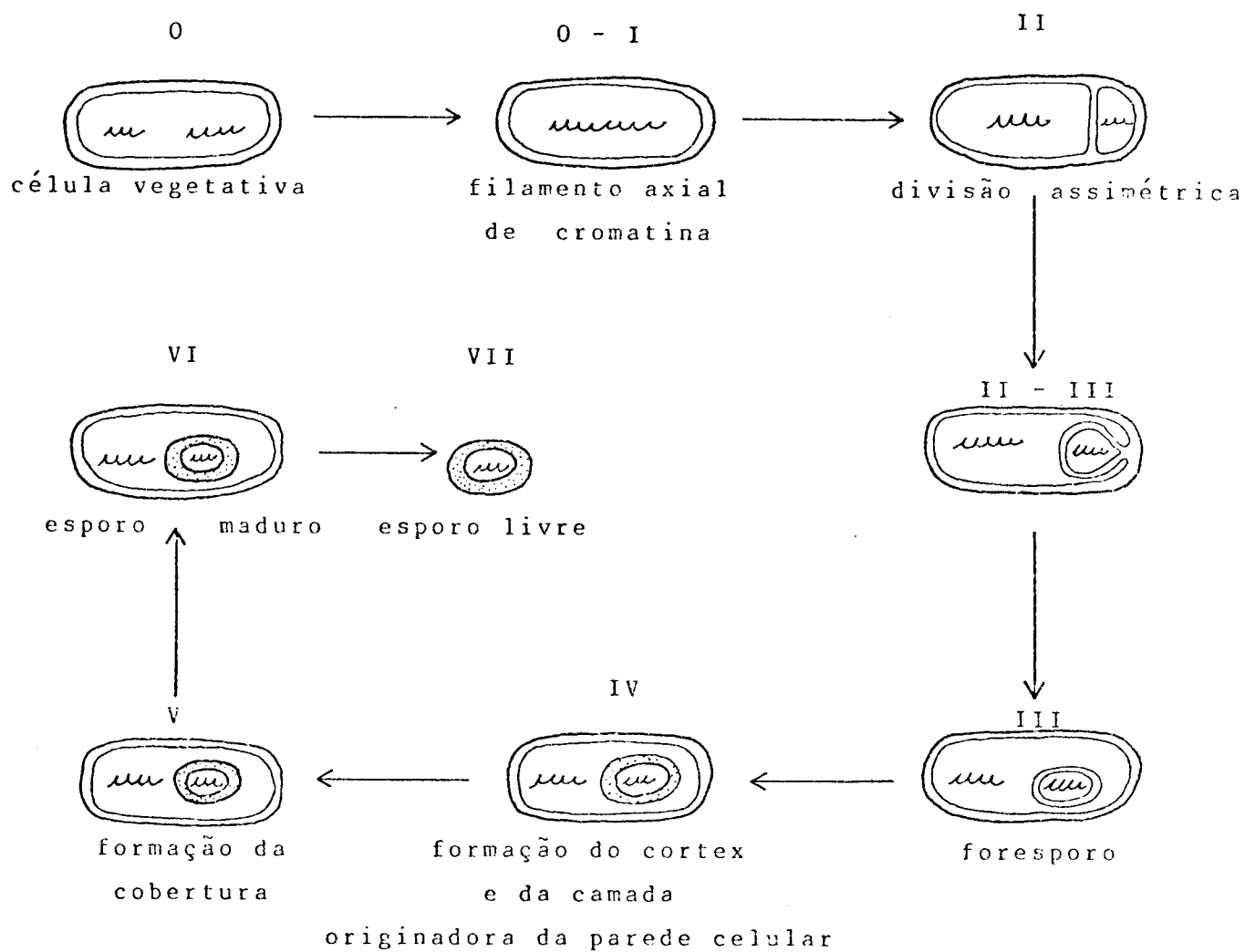


FIGURA 2 - Representação esquemática de mudanças morfológicas associadas à esporulação (adaptado de GOULD, 1977 e YILDIZ, 1978).

O estágio 0 corresponde a célula vegetativa. No estágio I o material nuclear se condensa para formar um único filamento axial de cromatina. No estágio II forma-se um septo pela invaginação da membrana celular e o esporo se desenvolve num dos polos da célula. No estágio III o protoplasma do esporo é envolvido por duas membranas, formando o foresporo que já se encontra livre na célula. No estágio IV, entre as membranas do foresporo, forma-se a camada originadora da parede celular, a partir da membrana interna, e o cortex, a partir da externa. No estágio V a cobertura do esporo se deposita em torno da membrana externa envolvendo o cortex. No estágio VI o esporo já está maduro e no VII ocorre sua liberação após a lise da célula mãe (GOULD, 1977; YILDIZ, 1978; GOMBAS, 1983).

Em geral, o esporo bacteriano tem uma forma esferóide com diversas camadas concêntricas (Figura 3). No centro está o protoplasma que contém DNA, RNA, enzimas e outros componentes necessários à conversão do esporo em célula vegetativa. As camadas subsequentes que fazem parte do esporo, do interior para fora, são a membrana interna, a camada originadora da parede celular, o cortex, a membrana externa, a cobertura e às vezes o exosporio. Na formação de uma nova célula vegetativa, o protoplasma, a membrana interna e a camada originadora da parede celular dão origem, respectivamente, ao protoplasma, à membrana celular e à parede celular da célula emergente. Além disso, o cortex é hidrolisado e as demais camadas descartadas (GOMBAS, 1983).

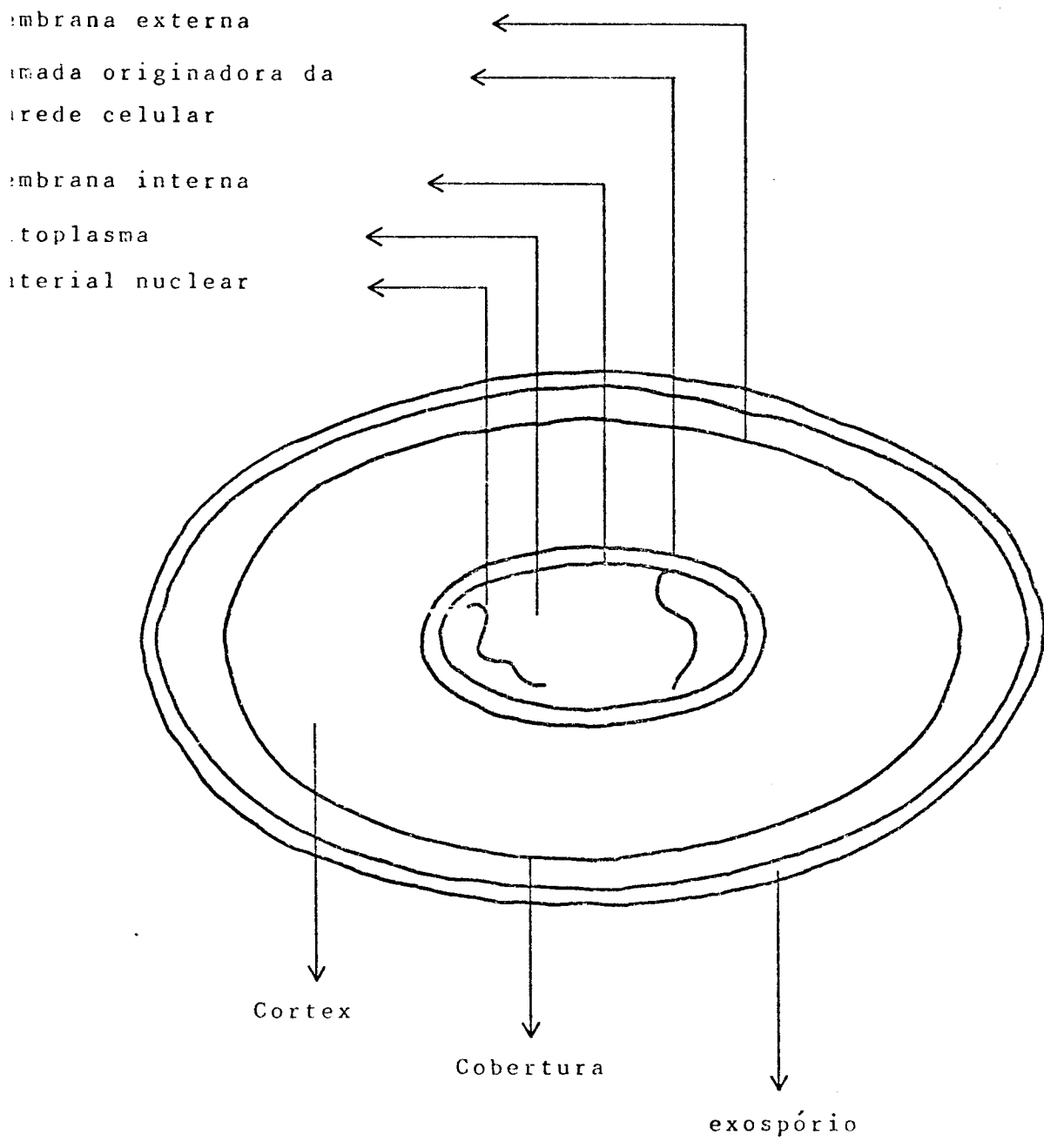


FIGURA 3 - Representação esquemática da morfologia do esporo bacteriano.

A conversão dos esporos em células vegetativas envolve quatro etapas bem estabelecidas: a ativação, a germinação, o crescimento pós-germinação e a multiplicação (WYATT & WAITES, 1975; BLOCHER & BUSTA, 1983; COOK & PIERSON, 1983; SNEATH, 1986).

A ativação prepara a etapa de germinação e geralmente é um tratamento subletal que não provoca profundas alterações no esporo. Tratamento térmico subletal, redução de pontes dissulfídricas, exposição a pH extremo, abrasão e radiação são exemplos de processos de ativação do esporo bacteriano (COOK & PIERSON, 1983).

A germinação é o estágio no qual a dormência está definitivamente terminada (KEYNAN et alii, 1964). É um processo degradativo em que as propriedades características dos esporos são perdidas (BLOCHER & BUSTA, 1983). Os esporos tornam-se sensíveis ao calor e aos agentes químicos; perdem cálcio, ácido dipicolínico e também a refratibilidade; aumentam a capacidade de coloração e diminuem a densidade ótica (COOK & PIERSON, 1983).

A germinação, cujo mecanismo ainda não está bem esclarecido, pode ser iniciada pelo denominado mecanismo de gatilho. Este mecanismo requer a presença de germinantes que podem ser vários, dependendo do microrganismo e de outras condições. São germinantes alguns aminoácidos (L-alanina, l-cistina), ribosídeos (inosina, adenosina), açúcares (glucose, frutose), lactato, bicarbonato, dipicolinato de cálcio, entre outros (COOK & PIERSON, 1983).

Já no crescimento pós-germinação o esporo intumescce pela entrada de água e nutrientes e em seguida alonga-se resultando na nova célula vegetativa. Uma das primeiras mudanças metabólicas que surgem nessa etapa é a síntese de proteínas. Nessa fase também ocorrem as sínteses de parede celular e de enzimas essenciais à multiplicação. A síntese de DNA acontece durante o alongamento (COOK & PIERSON, 1983).

Finalmente, a multiplicação é a última etapa no processo de conversão do esporo em célula vegetativa. E quando os microrganismos aumentam em número.

2.2.1. RESISTÊNCIA DOS ESPOROS AOS AGENTES QUÍMICOS

Enquanto as células vegetativas são rapidamente eliminadas na maioria das vezes pelos sanificantes, os esporos são muito mais resistentes. A forma esporulada de uma espécie pode ser cerca de 10^5 vezes mais resistente do que as formas vegetativas quando submetida ao calor (GOULD, 1977) e entre 10^2 e 10^4 vezes quando se usam agentes químicos (FOEGEDING, 1983).

No entanto, essa resistência dos esporos é variável com o microrganismo, seu gênero e espécie. Quanto ao gênero, foram necessários de 1 a 40 mg/l de cloro disponível para inativar de 1 a 3×10^2 esporos por mililitro, em 15 a 30 segundos de contato, se o microrganismo era anaeróbio (Clostridium) e de 18 a 280 mg/l se o microrganismo era aeróbio (Bacillus), segundo FOEGEDING em 1983. Uma pesquisa revelou que o número de esporos de Clostridium era reduzido em 90% num período

de 2 a 3 minutos quando submetidos a 2 mg/l de ácido hipocloroso, enquanto para a mesma redução eram necessários entre 20 e 50 minutos se o esporo fosse do gênero Bacillus (ITO et alii, 1968 apud ODLAUG e PFLUG, 1976). De forma análoga, os esporos de B. subtilis foram mais resistentes que os esporos de oito espécies de Clostridium após serem submetidos à soluções com 5 mg/l de cloro disponível livre em pH 8,3 e na temperatura de 10°C (DYE & HEAD, 1972).

A diferença de resistência entre os gêneros Bacillus e Clostridium foi constatada também quando uma solução com água oxigenada a 0,3% na temperatura de 54,5°C em 1 minuto de contato reduziu o número de esporos de B. subtilis em 29,3%, enquanto a redução nos esporos de C. butyricum foi de 57,5% (ROUNDY, 1958). Esses resultados se confirmaram posteriormente, quando a água oxigenada a 35%, em temperatura de 87,8°C, eliminou 1×10^6 esporos de C. botulinum, Bacillus stearothermophilus e B. subtilis globigii em 3, 14 e 16 minutos, respectivamente (ITO et alii, 1973).

Quanto às espécies microbianas, também ocorrem diferenças em suas resistências aos agentes químicos. Por exemplo, para se obter 99% de redução do número de esporos de Bacillus cereus e de B. subtilis por soluções com 100 mg/l de cloro disponível livre em pH 8,0 foram necessários, respectivamente, 5 e 60 minutos (COUSINS & ALLAN, 1967). Já os valores D obtidos da parte logarítmica das curvas de sobreviventes foram, respectivamente, 0,25, 0,46 e 0,75 minutos após contato dos

esporos de B. subtilis, Bacillus pumilis e Bacillus laterosporus com soluções de 150 mg/l de cloro disponível em pH 7,0 e na temperatura de 25°C (WANG et alii, 1973).

Também espécies de Clostridium em suspensão com 1×10^6 UFC/ml apresentaram diferenças de resistência após serem submetidos a soluções com 5 mg/l de cloro disponível livre em pH 8,3 e temperatura de 10°C: o número de esporos de Clostridium perfringens não sofreu alteração num período de exposição de 60 minutos; porém os números de Clostridium hystoliticum, Clostridium tertium, Clostridium bifermentans e Clostridium sporogenes apresentaram reduções que variavam entre 90 e 99,99% nos tempos de contato de 10 a 35 minutos (DYE & MEAD, 1972).

Até as estirpes de uma mesma espécie podem diferir em suas resistências aos agentes químicos. Isto foi constatado quando se verificou que os tempos de contato necessários para uma redução de 99,99% no número de esporos de C. botulinum dos tipos A, B, C, E e F foram respectivamente 10,5, 12, 3, 6 e 8 minutos após serem submetidos a soluções com 4,5 mg/l de cloro disponível livre em pH 6,5 na temperatura de 25°C (ITO & SEEGER, 1980).

A resistência dos esporos aos agentes químicos depende também da forma em que se encontram (na forma seca ou em suspensão), das condições em que ocorreu a esporulação e ainda da técnica de preparo e obtenção dos lotes de esporos. Verificou-se, por exemplo, que os esporos de C. botulinum na forma seca foram mais resistentes do que em suspensão, quando submetidos à ação da

água oxigenada. Por outro lado, o inverso ocorreu quando o esporo avaliado foi o B. subtilis globigii. Nesse caso, a forma seca foi a menos resistente (SMITH & BROW, 1980).

A influência das condições de esporulação na resistência dos esporos foi constatada quando se observou que os esporos de B. subtilis produzidos em meio BS (Bacillus spore medium) foram cerca de 20 vezes mais resistentes à ação do cloro do que aqueles produzidos em quatro outros meios de cultura (BAYLIS et alii, 1981). Essa influência foi observada também quando se avaliou a resistência dos esporos após diversos tempos em que o microrganismo ficou no meio de esporulação. Assim, para os tempos de 1, 6 e 14 dias foram necessários 86, 98 e 108 minutos para se obter 99% de redução do número de esporos de B. subtilis, após serem submetidos à soluções com 1000 mg/l de cloro disponível livre em pH 11 e temperatura de 20°C (GORNAN et alii, 1984b).

Com relação ao preparo e obtenção dos lotes de esporos, observou-se que até mesmo o número de lavagens dos esporos afetou sua resistência. Quando foram efetuadas três lavagens nos esporos produzidos em 24 horas de incubação, o tempo necessário para reduzir 99% do número de esporos de B. subtilis submetidos a 1000 mg/l de cloro disponível livre em pH 11 na temperatura de 20°C foi de 87 minutos; esse tempo diminuiu para 78 minutos quando se efetuaram sete lavagens (GORNAN et alii, 1984a).

A resistência dos esporos é ainda dependente das concentrações, dos valores de pH, das temperaturas e dos tipos de agentes químicos das soluções cloradas. Um inter-relacionamento entre a concentração, o pH e a temperatura foi verificado, por exemplo, quando soluções cloradas com 20 mg/l de cloro disponível livre, numa temperatura de 15°C, reduziram 90% do número de esporos de Bacillus coagulans em 13 minutos quando o pH era 7,8; porém, se o pH fosse abaixado para 6,8 ou 4,5 esse tempo diminuía para 9,0 e 4,0 minutos. Aumentando-se a temperatura da solução clorada para 60°C os tempos para reduzirem os mesmos 90% do número de esporos e nos mesmos valores de pH foram, respectivamente, 1, 0,25 e 0,30 minutos (LaBREE et alii, 1960). A inter-relação entre esses fatores foi verificada também quando se analisaram os valores D de suspensão de esporos de B. cereus submetidos à ação de soluções com 150 mg/l de cloro disponível livre. Nesta concentração, na temperatura de 25°C, os valores D de esporos de B. cereus foram respectivamente 0,10, 0,25 e 1,10 minutos para os valores de pH de 5,2, 7,0 e 8,0. O aumento da temperatura da solução clorada de pH 7,0 para 50 e 75°C, diminuiu os valores D dos esporos para 0,15 e 0,10 minutos, respectivamente (WANG et alii, 1973).

Vários trabalhos têm demonstrado a influência do tipo de agente químico na resistência que os esporos apresentam. Soluções de hipoclorito de sódio, com 200 mg/l de cloro disponível livre e de dióxido de cloro com 25 mg/l, ambas em pH 6,5 e temperatura de 25°C, necessitaram 9 e 13 minutos, respectivamente, para reduzir 99,99% do número de Bacillus

stearothermophilus (ITO, 1981). Isso significa que as eficiências desses compostos clorados são diferentes pois era de se esperar que o dióxido de cloro, em concentração oito vezes menor, demorasse um tempo bem maior do que 13 minutos para atingir o nível de redução mencionado na população dos esporos.

Eficiências diferentes constataram-se também quando soluções de cloramina T, com 1000 mg/l de cloro disponível total em pH 6,5, não reduziram o número de esporos de B. subtilis em 4 horas, enquanto soluções de hipoclorito de sódio, com 100 mg/l de cloro disponível livre em pH 8,0, reduziram 99% do número dos esporos em 60 minutos (COUSINS & ALLAN, 1967). Considerando-se que as soluções de cloramina T eram mais concentradas e com valores de pH mais baixo, esperava-se que elas fossem mais esporicidas que as de hipoclorito de sódio.

Por outro lado, tem-se observado que a associação de produtos químicos pode aumentar a ação esporicida. Por exemplo, as aplicações sucessivas de água oxigenada e iodóforo aumentaram a eficiência desses agentes químicos. O uso de água oxigenada a 5% (temperatura de 15°C por 1 a 2 horas) seguida de iodóforo (concentração de 25 mg/l em 24 horas de contato) eliminou esporos de C. sporogenes secos aderidos em cilindros de epoxy. Entretanto, as soluções separadamente não provocaram a morte desses esporos nas condições citadas (CHUNG et alii, 1979). Uma outra pesquisa mostrou que a adição de 25% de metanol em soluções de hipoclorito de sódio com 1000 mg/l de cloro disponível livre em pH 10,6 e temperatura de 20°C diminuiu o

valor D de esporos de *B. subtilis* de 20 minutos para 7,0 e 15,5 minutos dependendo do tempo em que o microrganismo ficou no meio de esporulação (GORMAN et alii, 1983, 1984a).

2.2.2. CURVAS DE SOBREVIVÊNCIA DOS ESPOROS À AÇÃO DE AGENTES FÍSICOS E QUÍMICOS

Além da forma logarítmica, a curva de esporos sobreviventes à ação do calor, radiações e agentes químicos pode apresentar as formas sigmoidal, côncava, convexa ou bifásica quando se localizam num gráfico os pontos referentes às intercessões dos logaritmos decimais dos números de sobreviventes em função do tempo do tratamento esporicida (CERF, 1977).

Estes tipos de curvas de sobreviventes surgem em função de desvios da forma logarítmica: a fase lag e a cauda. Relatos de um ou de ambos desvios são observados para diversos agentes esporicidas, dentre os quais se incluem, além do cloro (JONES Jr., 1968; DYE & MEAD, 1973; WANG et alii, 1973; GORMAN et alii, 1983; FOEGEDING et alii, 1986), o ozônio (ISHIZAKI et alii, 1986), o óxido de etileno (DADD et alii, 1985), o ácido peracético (BAYLIS et alii, 1981), a água oxigenada (CERF & HEMIER, 1972; CERF & METRO, 1977; SMITH & BROW, 1980; BAYLIS & WAITES, 1976; STEVENSON & SHAFER, 1983) e o calor (RUSSEL, 1971).

A fase lag ocorre no início do tratamento com agentes esporicidas (JONES Jr. et alii, 1968; DYE & MEAD, 1972; GORMAN et alii, 1983). Esse desvio pode ser explicado pelo equilíbrio entre a ativação e a destruição dos esporos. Ocorre o

aparecimento da fase lag se a ativação for igual ou maior que a destruição (RUSSEL, 1971).

Em sua pesquisa, FOEGEDING et alii (1986) sugeriram que a cobertura foi a responsável pela presença e extensão da fase lag em esporos de Bacillus e Clostridium tratados com dióxido de cloro. Esses autores mostraram que os esporos de B. cereus, sem a cobertura ou com ela parcialmente destruída, apresentavam curvas de sobreviventes sem a fase lag após o contato com o dióxido de cloro. Além disso, a diferença de resistência entre as espécies avaliadas foi mais nítida na fase lag do que na fase logarítmica.

A cauda, ao contrário da fase lag, ocorre no final do tratamento esporicida. Dentre as explicações para esse desvio estão: 1) a maior resistência de uma pequena parte de esporos numa população aparentemente homogênea; 2) as modificações na resistência dos esporos durante o tratamento letal; 3) as alterações ocorridas no tratamento letal durante sua aplicação, tornando-se subletal; 4) as técnicas inadequadas de recuperação de sobreviventes, por exemplo, o tempo excessivo de incubação em determinados meios de cultura; 5) as aglomerações de esporos, aumentando suas resistências (CERF, 1977; CERF & METRO, 1977; SMITH & BROW, 1980; GORMAN et alii, 1983; ABABOUC et alii, 1986; FOEGEDING et alii, 1986).

2.2.3. O ESPORO COMO INDICADOR BIOLÓGICO DOS TRATAMENTOS ESPORICIDAS

Os esporos bacterianos têm sido amplamente usados como indicadores biológicos para avaliação da eficiência dos tratamentos esporicidas pelo calor, agentes químicos, gases e radiações. Geralmente, a escolha de um indicador biológico para essa finalidade recai sobre um microrganismo aeróbio, não patogênico e que não apresente dificuldades na produção, recuperação e estocagem dos esporos (HOXEY, 1985). Além disso, é importante que o esporo escolhido diferencie as eficiências dos tratamentos esporicidas. Essas eficiências podem ser medidas pela eliminação completa, pela porcentagem de redução num determinado tempo de contato, pelo tempo requerido para se eliminar uma determinada porcentagem ou pelo valor D de uma população de esporos.

Os esporos de B. stearothermophilus são intensivamente usados no controle da esterilização comercial pela autoclavagem (LEE et alii, 1979; PFLUG et alii, 1980; LEAPER, 1984b). Por outro lado, as mais diversas estirpes de B. subtilis têm sido usadas para avaliarem a ação do calor seco (PEELER et alii, 1977; PULEO et alii, 1980), do óxido de etileno (REICH, 1980; DADD et alii, 1986), do glutaraldeído (ESKENAZI, 1982), da água oxigenada (WALEN & WALKER, 1979, 1980; LEAPER, 1984b, 1988), dos iodóforos (GORNAN et alii, 1985a), do ácido peracético (LEAPER, 1984a) e das radiações infravermelhas e ultravioletas (HOLIN & OSTLUND, 1975; ABSHIRE et alii, 1980).

De forma análoga, os compostos clorados têm sido avaliados por vários esporos. Dentre eles incluem-se os esporos de B. coagulans, de B. cereus, de B. subtilis, de Bacillus macerans, de B. stearothermophilus, de C. perfringens, de C. botulinum, entre outros (ODLAUG & PFLUG, 1976; ITO & SEEGER, 1980; FOEGEDING, 1983; STALKER & THORPE, 1984).

2.2.4. ESTABILIDADE DO NÚMERO DE ESPOROS E DA SUA RESISTÊNCIA AOS AGENTES FÍSICOS E QUÍMICOS DURANTE O ARMAZENAMENTO

A armazenagem dos esporos bacterianos usados na avaliação da eficiência de agentes esporicidas tem sido objeto de estudo de alguns pesquisadores. Para isso, o número e a resistência dos esporos à ação do calor, do óxido de etileno, da água oxigenada, do ácido peracético, do cloro, entre outros, são avaliados, em determinados períodos de tempo de armazenamento, sob refrigeração ou congelação dos esporos, em suspensão, secos ou liofilizados (LEVINE, 1952; HARNULV et alii, 1977; REICH, 1980; ODLAUG et alii, 1981).

Apesar de poucas e às vezes contraditórias, as pesquisas disponíveis na literatura têm demonstrado que o número de esporos e também sua resistência aos agentes esporicidas permaneceram constantes ou apenas se alteraram ligeiramente sob determinadas condições de armazenagem. Por exemplo, o número de esporos de B. stearothermophilus (suspensos em 15,6, 31,5, 47,9, 64,8, 88 e 100% de glicerol) e sua resistência ao calor não se alteraram em 3 semanas de armazenamento a -18°C (HARNULV et alii, 1977). Noutro experimento, o logaritmo do número de

esporos de B. subtilis (liofilizados em tampão fosfato H/15 e mantidos entre 28 e 30°C) diminuiu em apenas 0,3 reduções decimais durante o armazenamento, mas a resistência ao calor permaneceu constante, com o valor D entre 0,44 e 0,54 minutos, por um período de 9 a 27 meses de armazenagem (ODLAUG et alii, 1981).

Resultados semelhantes foram encontrados quando se analisaram, durante o armazenamento, o número e a resistência de esporos de B. subtilis submetidos ao óxido de etileno. Os parâmetros avaliados não apresentaram diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade quando os esporos foram armazenados ao longo de 24 meses em temperatura ambiente (20 - 22°C) ou sob congelamento (-20°C) em umidade relativa de 40% (REICH, 1980). Entretanto, sob as mesmas condições, o número de B. stearothermophilus diminuiu ligeiramente.

Também a resistência dos esporos de E. subtilis e de B. subtilis globigii (armazenados em água destilada a 4°C) submetidos à ação da água oxigenada permaneceu constante por 134 semanas. Entretanto, no mesmo experimento verificou-se que a resistência dos esporos de B. subtilis globigii submetidos ao ácido peracético aumentou ao longo do armazenamento (LEAPER & BLOOR, 1988).

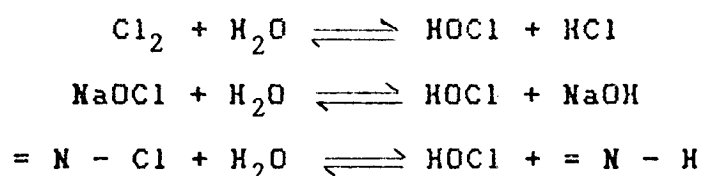
Encontra-se na literatura um trabalho que constatou a estabilidade do número de esporos de B. metiens e da sua resistência à ação do hipoclorito de sódio durante o armazenamento. Em 10 mg de esporos secos, adicionados de lactose, o número manteve-se entre 9,0 e $9,9 \times 10^7$, no período de 150 dias.

Já o número de esporos suspensos em solução de Buterfield e refrigerados entre 6 e 10°C permaneceu entre $1,3$ e $2,5 \times 10^7$, durante 240 dias. Quando submetidos à ação de 1000 mg/l de cloro disponível livre em pH 11,1 e temperatura de 20°C, o tempo necessário para reduzir em 99% o número de esporos secos variou entre 38 e 42,5 minutos, no período de 150 dias, enquanto que para os esporos em suspensão esses valores de tempo ficaram entre 90 e 102 minutos, durante os 240 dias (LEVINE, 1952).

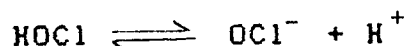
2.2.5. MECANISMO DE AÇÃO ESPORICIDA DOS COMPOSTOS CLORADOS

Os compostos clorados, com exceção do dióxido de cloro, apresentam uma forma semelhante de ação esporicida: quando quaisquer produtos clorados inorgânicos ou orgânicos estão em solução aquosa, libera-se o ácido hipocloroso, em sua forma não dissociada, que apresenta ação sobre a cobertura do esporos (ODLAUG & PFLUG, 1978; ODLAUG, 1981; FOEGEDING, 1983). O dióxido de cloro não se hidrolisa em solução aquosa e a molécula inteira é considerada o agente ativo (ODLAUG, 1981).

As hidrólises dos compostos clorados inorgânicos estão abaixo representadas pelo Cl_2 e pelo NaOCl enquanto as cloraminas orgânicas são representadas pelo $=\text{N}-\text{Cl}$ (TRUEHAN, 1971).



O ácido hipocloroso é um ácido fraco cuja constante de dissociação, a 30 °C, é $3,18 \times 10^{-8}$ (MORRIS, 1966) e em solução aquosa se dissocia para formar o íon hidrogênio e o íon hipoclorito:



A constante de dissociação (pka) do ácido hipocloroso, o pH e a concentração em cloro disponível livre determinam a quantidade de ácido hipocloroso nas soluções cloradas. Esses fatores podem ser relacionados num rearranjo da equação de Henderson - Hasselbalch (BLOCHER & BUSTA, 1983) para determinarem a concentração de ácido hipocloroso nas soluções:

$$\text{mg/l de Ácido hipocloroso} = \frac{\text{mg/l de cloro disponível livre}}{1 + 10^{\text{pH} - \text{pka}}}$$

Esta equação mostra o quanto é importante o pH da solução clorada, pois em pH 10 tem-se apenas 0,3% de ácido hipocloroso, valor que atinge 99,7% em pH 5,0. Portanto, os compostos clorados são mais efetivos em valores de pH baixos, quando a presença de ácido hipocloroso é dominante.

Ainda com relação à forma de agir dos compostos clorados, existe um consenso entre os pesquisadores de que é a cobertura do esporo que o protege da ação desses agentes químicos. A cobertura do esporo é a barreira à permeabilidade ao cloro, mas também é a camada onde ele inicia a ação oxidante

(WYATT & WAITES, 1973; KULIKOWSKY et alii, 1975; ODLAUG, 1981; FOEGEDING, 1983; FOEGEDING & BUSTA, 1983a; FOEGEDING et alii, 1986). Não é coincidência, portanto, o fato de que a resistência aos agentes químicos, inclusive ao cloro, apareça no estágio V da esporulação, quando se forma a cobertura do esporo (GORKAN et alii, 1984a).

A falta de integridade ou a remoção da cobertura do esporo aumenta o efeito letal do cloro. Sabe-se que tratamentos com agentes químicos que removem proteína da cobertura podem aumentar o efeito esporicida do cloro em até 4.000 vezes (WYATT & WAITES, 1975). Verificou-se também que a falta de integridade e a ausência da cobertura tornaram os esporos de *B. cereus* muito mais susceptíveis à ação esporicida do dióxido de cloro (FOEGEDING et alii, 1986).

As duas teorias que tentam explicar a ação esporicida do cloro envolvem a cobertura do esporo. Uma delas afirma que o cloro combina-se e remove proteínas da cobertura e de camadas subsequentes, resultando num aumento da permeabilidade ao agente químico e, conseqüentemente, da susceptibilidade à destruição (KULIKOWSKY, 1975; FOEGEDING, 1983). A outra teoria sugere que o cloro estimula a germinação pela alteração da permeabilidade da cobertura, para em seguida inativar o esporo germinado (WYATT & WAITES, 1973).

Apesar de não se referir ao mecanismo de ação, é importante mencionar um trabalho relativo à ação do ácido hipocloroso sobre os esporos. Encontrou-se uma relação linear

simples válida para todos os esporos de Bacillus e Clostridium analisados, quando foram localizados num gráfico os pontos referentes às intercessões dos logaritmos dos tempos para reduzir em 90% o número de esporos e os logaritmos das concentrações de ácido hipocloroso. Os dados, que levaram a essa importante conclusão, foram obtidos de vários trabalhos relativos à ação esporicida do cloro, após terem sido calculadas as concentrações de ácido hipocloroso a partir do pH e da concentração em cloro disponível livre (ODLAUG & PFLUG, 1976; ODLAUG, 1981).

2.3. AVALIAÇÃO DE SANIFICANTES NA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

A indústria de alimentos deve dispor de técnicas microbiológicas que avaliem adequadamente os sanificantes usados nos procedimentos de higienização de pisos, paredes, tetos, equipamentos e utensílios, entre outros.

A avaliação microbiológica das formulações de sanificantes químicos é fundamental, pois apenas a determinação da concentração do princípio ativo na solução não é suficiente para medir o poder de destruição microbiana desses produtos. A ação do sanificante é dependente também de outros fatores como solubilidade, miscibilidade, nível de dispersão coloidal, tensão superficial, etc (BASS, 1977; GONTIJO FILHO, 1986).

Diversos métodos microbiológicos são disponíveis para avaliarem os sanificantes usados na indústria de alimentos.

Em seu trabalho de revisão, LEITAO (1984) aborda os princípios básicos e discute os principais testes recomendados pela AOAC (ENGLER, 1984). Dentre esses testes incluem-se o teste do coeficiente fenólico, o teste da diluição de uso, o teste da concentração equivalente ao cloro disponível, o teste de suspensão, o teste de capacidade e o teste esporicida.

Além desses são disponíveis também os denominados testes em uso (SCHEUSNER, 1982) representados pelos testes da zaragatoa, da placa de contato (RODAC) e da lavagem da superfície (APHA, 1976) que avaliam a ação dos sanificantes sobre microrganismos presentes nas superfícies dos equipamentos e utensílios da indústria de alimentos.

Finalmente, encontram-se na literatura recomendações sobre os testes em uso simulados que consistem em transportar para o laboratório as condições existentes na indústria exigindo, às vezes, o desenvolvimento de metodologias e equipamentos (SCHEUSNER, 1982).

Os testes mencionados serão discutidos sucintamente a seguir.

2.3.1. TESTE DO COEFICIENTE FENÓLICO

O teste do coeficiente fenólico foi, praticamente, a primeira proposição de método microbiológico padronizado para avaliar a eficiência dos sanificantes (BASS, 1977; LEITAO, 1984). A metodologia deste teste tem recebido várias propostas de modificações ao longo do tempo, mas em todas elas permanece o

fundamento básico original: a comparação da eficiência do sanificante contra uma solução-padrão de fenol, ambas atuando sobre células vegetativas de bactérias. A AOAC (ENGLER, 1984) recomenda como organismos-testes as culturas padronizadas de Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442, Staphylococcus aureus ATCC 6538 e Salmonella typhi ATCC 6539.

Determina-se o coeficiente fenólico dividindo-se a maior diluição do sanificante que destrói o organismo-teste em 10 minutos, mas não em 5 minutos, pela maior diluição de fenol dando os mesmos resultados (LEITAO, 1984). Geralmente é aceito que multiplicando o coeficiente fenólico obtido para S. typhi por 20, encontra-se a diluição que se deve usar para o sanificante avaliado. Por exemplo, se o coeficiente fenólico obtido é 4,0, significa que se pode diluir uma parte do sanificante em 80 partes de água.

O teste do coeficiente fenólico apresenta restrições. Ele é pouco reprodutível, sua precisão é discutível quando avalia sanificantes que diferem do fenol quanto à composição química e sua metodologia não permite simular situações da indústria de alimentos. Em consequência dessas restrições, as concentrações recomendadas pelo teste devem ser confirmadas por outros testes, particularmente o da diluição de uso (ENGLER, 1984; LEITAO, 1984).

2.3.2. TESTE DA DILUIÇÃO DE USO

O teste da diluição de uso, reconhecido como rigoroso e bem padronizado, consiste em submeter células de Salmonella choleraesuis ATCC 6539, de S. aureus ATCC 6538 e de P. aeruginosa ATCC 15442 aderidas às superfícies de cilindros de aço inoxidável à ação do sanificante. Em síntese, seu objetivo é confirmar o resultado do teste do coeficiente fênolico, determinando-se a maior diluição do sanificante, considerada segura para uso em condições práticas, que destrói o organismo-teste aderido em 10 cilindros de transporte em 10 minutos (LEITAO, 1984). É o método recomendado nos Estados Unidos pela EPA ("Environmental Protection Agency") para registro e especificações comerciais de sanificantes (TROUT, 1985; GONTIJO FILHO & ROMAO, 1986). Apesar de amplamente aceito, ainda são realizadas pesquisas com o objetivo de melhorar a eficiência deste método tentando-se padronizar o número de bactérias na superfície do cilindro (COLE, 1987a) e o uso de outros cilindros, além do aço inoxidável, como a porcelana e o vidro (COLE, 1987b) e também o alumínio e o polipropileno (GELINAS & GOULET, 1983b).

O teste da diluição de uso foi aplicado em algumas pesquisas para avaliar os efeitos da temperatura e tempo de contato (GELINAS et alii, 1984), da luz (GELINAS & GOULET, 1982) e da matéria orgânica (GELINAS & GOULET, 1983a) na ação de sanificantes sobre P. aeruginosa ATCC 15442. No desenvolvimento destas pesquisas, os autores constataram algumas interferências, entre as quais estão: 1) as dificuldades em diferenciar entre a ação sanificante e a ação de detergência que retirou os micror-

ganismos dos cilindros, 2) a não simulação adequada das condições usuais da indústria de alimentos, principalmente na avaliação da matéria orgânica aderida sob diversas formas e condições nas superfícies dos equipamentos, 3) a constatação de que a P. aeruginosa ATCC 15442, microrganismo indicado pela AOAC, produzia um polissacarídeo que protegia a bactéria.

Além das restrições acima mencionadas, BASS (1977) afirma que os cilindros, às vezes, incorporam aos meios de recuperação quantidades mínimas do sanificante, mas que podem ser bacteriostáticos. Também há possibilidade dos microrganismos aderidos às superfícies dos cilindros serem protegidos contra a ação do agente químico por filmes de matéria orgânica oriundos do meio de crescimento.

2.3.3. TESTE DE CAPACIDADE

O teste de capacidade avalia a manutenção da eficiência das soluções sanificantes após consecutivos contatos com microrganismos e matéria orgânica. Esta metodologia é mais flexível permitindo o uso de bactérias gram positivas ou gram negativas, de bolores e leveduras de acordo com o problema específico que se deseja avaliar. O teste é recomendado principalmente para sanificantes ou detergentes-sanificantes de uso em recipientes de estoques de pipetas ou outras vidrarias contaminadas e já utilizadas. Basicamente, o teste de capacidade verifica a possibilidade de reutilização do agente químico (LEITAO, 1984; GONTIJO FILHO & ROMAO, 1986).

2.3.4. TESTE DA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GERMICIDA EQUIVALENTE AO CLORO DISPONÍVEL

O teste da determinação da concentração de germicida equivalente ao cloro disponível é recomendado pela AOAC para avaliar produtos halogenados de uso em superfícies não porosas e previamente limpas (ENGLER, 1984). A metodologia do teste preconiza o uso de hipoclorito de sódio nas concentrações de 50, 100 e 200 mg/l de cloro disponível livre sobre o S. aureus e a S. typhi, como padrões para comparar com a eficiência de iodóforos, de mistura de halogénios, como o cloro e bromo, e dos demais compostos clorados inorgânicos e orgânicos (ENGLER, 1984; LEITAO, 1984; LOPES, 1986).

2.3.5. TESTE DE SUSPENSÃO

O teste de suspensão é recomendado pela AOAC para avaliar sanificantes usados em superfícies não porosas e previamente limpas que entram em contato com alimentos. Inicialmente reportado por BUTTERFIELD e colaboradores, em 1942, teve a metodologia que hoje se utiliza estabelecida por CHAMBERS, em 1956. Basicamente, o método avalia o sanificante em função da porcentagem de redução do número das bactérias Escherichia coli ATCC 11229 ou de S. aureus ATCC 6538 em suspensão ou das reduções decimais na população dessas bactérias, observadas em placas de Petri. Considera-se eficientes os sanificantes que obtêm eliminação de 99,999% (5 RD) em 30 segundos de contato (CHAMBERS, 1956; ENGLER, 1984).

A metodologia do teste de suspensão é flexível permitindo simular situações que ocorrem rotineiramente na indústria de alimentos. Por exemplo, pode-se avaliar alterações da concentração e do pH do sanificante e também na dureza e qualidade da água industrial. Por outro lado, devido a sua simplicidade, quando comparado ao teste da determinação da concentração equivalente ao cloro disponível, diversos pesquisadores utilizam-no inclusive para compostos halogenados (FREDELL et alii, 1985; LOPES, 1986). É talvez o teste mais indicado para avaliar os sanificantes usados na indústria de alimentos (GONTIJO FILHO, 1988).

Após o contato do microrganismo com o agente de desinfecção é fundamental o uso de inativadores do sanificante quando se utiliza a metodologia do teste de suspensão (ENGLER, 1984; LEITAO, 1984; GONTIJO FILHO & ROMAO, 1986). Recomenda-se para neutralizar os compostos clorados e os iodóforos solução de tiosulfato de sódio a 0,5%; enquanto que para os compostos de amônia quaternária usam-se soluções de tween 80 a 2% e também lecitina de ovo (2%) em solução aquosa de cirrassol a 3% (LEITAO, 1984).

2.3.6. TESTE ESPORICIDA

A AOAC descreve ainda um teste aplicável a substâncias químicas líquidas e gasosas para avaliar a atividade esporicida. O método, que determina a presença ou ausência de atividade esporicida, consiste em submeter esporos de B. subtilis ATCC 19659 e de C. sporogenes ATCC 3584, previamente secos em

cilindros de porcelana (8 ± 1 mm de diâmetro externo, 6 ± 1 mm de diâmetro interno e 10 ± 1 mm de comprimento), às soluções dos agentes químicos. Para ser classificado como esporicida, o agente químico, na concentração, tempo de contato e outras condições avaliadas, deve eliminar os esporos em 118 de 120 cilindros testados, metade deles com B. subtilis e a outra com C. sporogenes. Quando elimina os esporos em todos os cilindros, o agente químico é classificado como esterilizante (ENGLER, 1984).

2.3.7. TESTE EM USO

Segundo SCHEUSNER (1982), apesar dos testes de laboratório serem fáceis de executar, rápidos e fundamentais para o registro e especificações dos produtos comerciais, os testes em uso oferecem informações mais seguras sobre a ação do sanificante.

Os testes em uso são realizados após a sanificação de equipamentos, utensílios, pisos, paredes, etc., para avaliarem o número de microrganismos sobreviventes. Assim, consideram os fatores concentração, tempo e temperatura de contato e as condições prévias do procedimento de limpeza. Todos se baseiam na remoção e na recuperação dos microrganismos sobreviventes das superfícies sanificadas. A remoção dos microrganismos pode ser feita por atrito, como no método da zaragatoa (com alginato de sódio ou algodão), por contato, como no método das placas de contato (tipo RODAC) ou, ainda, através da lavagem da superfície com água destilada ou soluções apropriadas. A recuperação se faz conforme processos usuais de contagens microbianas usando neutra-

lizantes adequados para o sanificante sob avaliação (BALDOCK, 1974; SCHEUSNER, 1982; FAVERO et alii, 1984; SERRANO, 1984).

Estes testes também apresentam problemas. A verdadeira população microbiana de uma superfície, na maioria dos métodos, não é recuperada com exatidão (RICHARD & PITON, 1986). Por exemplo, a pressão exercida sobre a superfície, quando se removem os microrganismos sobreviventes com a zaragatoa, pode influir nos resultados. As placas de contato somente devem ser usadas em superfícies levemente contaminadas, no máximo 10 organismos por cm^2 , pois nesse método não ocorre diluição, já que é o próprio meio de cultura contido na placa que faz a remoção dos microrganismos (NISKANEN & POHJA, 1976; SCHEUSNER, 1982; SERRANO, 1984).

Em sua pesquisa, SCHEUSNER (1982) obteve 25, 91 e 92% de recuperação do número teórico de microrganismos presentes nas superfícies de equipamentos quando usou placas de contato, esponja de celulose e zaragatoa, respectivamente. Em contraste, NISKANEN & POHJA (1976) mostraram resultados que indicam ser o método de placa de contato melhor do que a zaragatoa para superfícies horizontais. Ambos os trabalhos concordam que o método da zaragatoa é o mais indicado para superfícies irregulares ou com elevado número de microrganismos.

2.3.8. TESTE EM USO SIMULADO

Os testes em uso simulados preconizam a transferência das condições da indústria para o laboratório. Para isso,

muitas vezes há necessidade do desenvolvimento de metodologias e equipamentos para simular com precisão as diversas condições dos usos dos sanificantes na indústria de alimentos. Portanto, estes testes são mais trabalhosos e exigem criatividade.

Para simular condições da indústria, SCHEUSNER (1982) usou uma bandeja de fibra de vidro de 35 X 45 cm na qual foram adicionados, além do inóculo microbiano (S. aureus e esporos de B. subtilis), resíduos de carne, leite e cereais. Após secagem, as bandejas foram submetidas às soluções sanificantes simulando condições usuais, como spray, imersão e enxaguagem. Em seguida, as bandejas eram imersas em soluções neutralizantes e os microrganismos sobreviventes, recuperados pela fricção da zaragatoa de algodão na superfície, enumerados pelos métodos convencionais.

Já STONE & ZOTTOLA (1985) simularam as condições de indústria para avaliarem o procedimento de higienização efetuado pelo processo de limpeza no lugar sobre Pseudomonas fragi que se adere em superfícies de aço inoxidável através de polissacarídeo que produz. Para executar o experimento, os autores montaram um sistema que consistiu de uma tubulação de aço inoxidável com 3,5 metros na qual circulavam 15 litros de leite desengordurado inoculado com P. fragi, uma bomba de pressão positiva e um tanque de equilíbrio.

Também, OLIVEIRA (1985) estudando a resistência de S. typhi e C. perfringens ao uso contínuo de hipoclorito de sódio e de um composto de amônio quaternário usou, num dos experi-

mentos, bandejas de aço inoxidável onde se espalharam 5 ml de caldo de carne e mais 1 ml de cultura microbiana; em seguida adicionou-se 5 ml do sanificante. Após o tempo de atuação do sanificante, com uma zaragatoa, coletaram-se amostras sobre 15 cm de três diferentes locais da superfície e, em seguida, transferiu-se a zaragatoa para tubos contendo meio de enriquecimento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAIS

3.1.1. SOLUÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO

A concentração exata em cloro disponível livre de uma solução de hipoclorito de sódio comercial (Lever Industrial, SP) foi determinada pelo método iodométrico (RICHARDSON, 1985). A partir da solução concentrada de hipoclorito foram preparadas soluções com 50, 75, 105, 150 e 200 mg/l de cloro disponível livre de pH 9,8 e uma solução com 105 mg/l de pH 9,0, 8,0 e 7,0. Essas soluções foram preparadas em tampão M/15 de Na_2HPO_4 sendo o pH 9,8 ajustado com NaOH 0,1N e os demais com HCl 0,1N. As concentrações exatas dessas soluções diluídas foram ajustadas pelo método iodométrico.

3.1.2. LOTES DE ESPOROS DE Bacillus subtilis ATCC 19659

Uma cultura liofilizada de células vegetativas de Bacillus subtilis ATCC 19659 (INCQS 02) foi obtida no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Osvaldo Cruz do Rio de Janeiro. As suspensões de esporos desse microrganismo foram preparadas utilizando-se adaptação da metodologia proposta pela National Canners Association (1968), conforme descrição a seguir.

Após três repicagens consecutivas em ágar nutriente (Difco), solidificado na posição inclinada em tubo de

ensaio de 15 X 160 mm e incubações de 24 horas a 30°C, de uma cultura de Bacillus subtilis ATCC 19659 (a partir de agora denominado de B. subtilis) foi obtida uma suspensão de células vegetativas pela adição de solução tampão de Butterfield (ICSHF, 1978) e agitação manual.

Em seguida, volumes de 1 ml dessa suspensão foram inoculados nas superfícies de 50 ml de meio de esporulação - 3,0 g de extrato de carne (Difco), 5,0 g de triptona (Difco), 1,0 g de amido (Reagen), 10,0 mg de sulfato de manganês (Carlo Erba) e 20,0 g de ágar (Difco) em 1000 ml de água destilada e pH final entre 6,9 e 7,1 - contidos em quatro Erlenmeyers de 500 ml. A incubação se prolongou por 96 horas quando havia cerca de 90 a 95% de esporos nos campos microscópicos observados em lâminas coradas pelo verde malaquita.

Ao fim desse período, adicionou-se 20 ml de água destilada sobre as superfícies do meio de cultura dos Erlenmeyers e pérolas de vidro estéreis. Os Erlenmeyers foram agitados manualmente, coletou-se o sobrenadante separadamente em quatro tubos de centrifuga com capacidade de cerca de 25 ml e centrifugou-se a 2.500 x g (5000 rpm) durante 15 minutos, a 4°C. Ressuspendeu-se os sedimentos de esporos em água destilada estéril, novamente centrifugou-se e o processo se repetiu por cinco vezes. Ao final, os esporos de cada tubo de centrifuga foram suspensos em glicerol e água (15 : 85) e, em seguida, ajuntados num único tubo de ensaio com capacidade de cerca de 60 ml, o que constituiu um lote.

O lote de esporos foi padronizado para conter em torno de 10^9 esporos por ml, usando-se espectrofotômetro. Esse número era obtido quando 1 ml dessa suspensão de esporos diluída em 30 ml de água destilada originava uma absorbância entre 0,4 e 0,5 a 600 nm. A confirmação final do número de esporos no lote, após choque térmico de 80°C por 15 minutos, foi feita em placas, com ágar para contagem total (EBL), incubadas a 30°C por 48 horas.

Para serem usados nos diversos experimentos foram preparados 19 lotes de esporos identificados de A a T.

3.1.3. EQUIPAMENTOS DE LABORATÓRIO

- Centrífuga refrigerada, marca Fanem, modelo FR 22;
- Liofilizador, marca Edwards;
- Espectrofotômetro, marca Bausch & Lomb, modelo Spectronic 20;
- Microscópio ótico, marca Zeiss, modelo D 7082;
- Potenciômetro, marca Micronal, modelo B 374;
- Demais equipamentos de uso comum em Laboratório de Microbiologia.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. REDUÇÕES DO NÚMERO DE ESPOROS DE *B. subtilis* DURANTE A AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO

A um Erlenmeyer de 250 ml contendo 99 ml da solução sanificante com 105 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 e temperatura de 30°C, preparada conforme 3.1.1., foi adicionado 1 ml dos esporos em suspensão já tratados termicamente, conforme descrito em 3.1.2. Após contatos de 60, 90, 120, 140, 160 e 180 minutos foi transferido 1 ml dessa mistura para um tubo de ensaio contendo 9 ml da solução neutralizante de tiossulfato de sódio a 0,25% em solução Ringer 1/4. A solução Ringer foi preparada conforme ICNSF (1978).

Para cada tempo de contato, diluições adequadas foram plaqueadas, em duplicata em placa de Petri, com adição de ágar para contagem total. Após a incubação a 30°C por 48 horas foram contadas as colônias.

As reduções decimais do número de esporos de *B. subtilis* foram determinadas pelas diferenças entre os logaritmos decimais do número inicial, já obtidos no item 3.1.2. e dos sobreviventes após cada tempo de contato.

O experimento foi efetuado em três repetições para cada um dos dez lotes de A a J.

3.2.2. REDUÇÕES DO NÚMERO DE ESPOROS DE *B. subtilis* DURANTE O ARMAZENAMENTO QUANDO SUBMETIDOS À AÇÃO DO HIPOCLO-RITO DE SÓDIO

Uma parte de cada um dos lotes R, S e T de esporos de *B. subtilis* foi suspensa em glicerol e água (15 : 85). Volumes de 4 ml dessas suspensões foram distribuídas em tubos de ensaio estéreis, de 10 x 100 mm, com tampa rosqueável e armazenados sob refrigeração a 4°C.

Uma outra parte de cada um desses lotes, também preparada conforme mencionado anteriormente, foi armazenada sob congelamento a -18°C.

Ainda, uma terceira parte dos mesmos lotes foi suspensa em tampão fosfato M/15 de pH 7,0 e distribuída em volumes de 4 ml em frascos do tipo usado para penicilina com capacidade de 30 ml, para ser submetida à liofilização. No liofilizador, esses frascos, inicialmente, permaneceram cerca de 30 minutos na câmara de congelamento previamente resfriada a -40°C. Após o congelamento as suspensões foram submetidas, na câmara de liofilização, a um vácuo de 10^{-3} mm de Hg, ficando as tampas dos frascos de forma a permitirem a saída do vapor de água. Ao fim de 12 horas, os frascos foram fechados sob vácuo, receberam um lacre de alumínio sobre a tampa de borracha e foram armazenados a 4°C.

Depois de uma semana (Tempo Zero) e aos 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias após, os esporos refrigerados, os congelados após descongelamento e os liofilizados (estes previa-

mente ressuspensos em 4 ml de tampão fosfato M/15 em pH 7,0) receberam um tratamento térmico de 80°C por 15 minutos. Em seguida, foram resfriados a 30°C e submetidos às contagens do número inicial e também dos sobreviventes após 145 minutos de contato com soluções de 105 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 e à temperatura de 30°C. As reduções nas populações de esporos foram obtidas pelas diferenças entre os logaritmos dos números iniciais e dos sobreviventes à ação do cloro.

3.2.3. REDUÇÕES DO NÚMERO DE ESPOROS DE *B. subtilis* QUANDO SUBMETIDOS À SOLUÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E VALORES DE PH

Os lotes L, M e N, preparados conforme 3.1.2., armazenados a 4°C e usados num período máximo de 90 dias, foram submetidos às soluções de hipoclorito de sódio nas concentrações de 50, 75, 150 e 200 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 à temperatura de 30°C. As reduções decimais do número de esporos dos lotes foram obtidas conforme técnica descrita em 3.2.1., a exceção dos tempos de contato que foram escolhidos dentro da faixa de morte acentuada, previamente determinados para cada solução avaliada. Esses tempos foram de 140, 180, 220, 240, 260 e 290 minutos para 50 mg/l; 80, 110, 140, 170, 190 e 220 minutos para 75 mg/l; 50, 65, 80, 95, 110 e 120 minutos para 150 mg/l e 40, 50, 55, 60, 65, 70 e 80 minutos para 200 mg/l.

Já os lotes O, P e Q, também preparados conforme 3.1.2., armazenados a 4°C e usados num período máximo de 90 dias, foram submetidos às soluções de hipoclorito de sódio com 105 mg/l

de cloro disponível livre em pH 9,0, 8,0 e 7,0. As reduções decimais do número de esporos desses lotes foram obtidas conforme descrição para os lotes L, H e N, mas os tempos de contato foram, de acordo com avaliação prévia, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 minutos para o pH 9,0; 1, 2, 3, 4 e 5 minutos para o pH 8,0 e 20, 40, 50, 60, 70 e 80 segundos para o pH 7,0.

O experimento foi executado em 3 repetições para cada lote de esporos.

3.2.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

A ação do hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre, pH 9,8 a 30°C) sobre os esporos de B. subtilis provenientes de diferentes lotes foi avaliada por meio das reduções decimais. Os efeitos dos diferentes lotes de esporos e do tempo de contato foram estudados por meio da análise de variância das reduções decimais segundo um modelo fatorial no delineamento inteiramente casualizado, em que os fatores foram tempo de contato (60, 90, 120, 140, 160 e 180 minutos) e lotes de esporos (A a J), com três repetições. Além disso, um modelo de regressão linear simples foi ajustado para reduções decimais em função do tempo de contato.

A estabilidade do número de esporos de B. subtilis e da sua resistência à ação do hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre, pH 9,8 e tempo de contato de 145 minutos a 30°C) ao tipo e período de armazenamento foi avaliada por meio do número de esporos por ml (UFC/ml) e das reduções

decimais. Os efeitos do tipo (refrigeração a 4°C, congelamento a -18°C e liofilização com estocagem à 4°C) e do período de armazenamento (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias) foram avaliados por meio da análise de variância do número de esporos e das reduções decimais, respectivamente, segundo um modelo fatorial no delineamento inteiramente casualizado com três repetições. No caso da interação tipo x período de armazenamento ser significativa ($P < 0,05$), o efeito do período foi estudado em cada tipo de armazenamento.

Para as determinações do valor do tempo de início de morte e do valor D, lotes de esporos foram submetidos à ação do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações, valores de pH e tempos de contato. Modelos de regressão linear simples foram ajustados para reduções decimais em função do tempo de contato em cada uma das soluções de hipoclorito de sódio.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. AÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO SOBRE OS ESPOROS DE *B. subtilis*

As reduções decimais do número de esporos de *B. subtilis*, apresentados nos Quadros 3 e 4, foram submetidas à análise estatística através da técnica de análise de variância conforme Quadro 5. Essa análise revela que não houve diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$) nas reduções decimais do número de esporos dos 10 lotes avaliados.

Constata-se, portanto, a possibilidade de se produzirem lotes desses esporos com mesma resistência à ação do cloro. Foi a padronização de todas as condições experimentais que tornou possível a produção dos lotes de esporos que apresentassem mesma resistência ao sanificante. Sabe-se que a resistência dos esporos é influenciada por vários fatores. Assim, ela varia com o gênero (DYE e HEAD, 1972; ODLAUG & PFLUG, 1976; ITO & SEEGER, 1980; ODLAUG, 1981; FOEGEDING, 1983), a espécie (COUSINS & ALLAN, 1967) e até mesmo a estirpe do microrganismo (ITO & SEEGER, 1980). E também afetada pela técnica de obtenção e preparo dos lotes de esporos como a composição do meio (BAYLLIS & WAITES, 1980), as condições de esporulação (FOEGEDING & BUSTA, 1983b; GORMAN et alii, 1984b) e, inclusive, o número de lavagens no procedimento de limpeza dos esporos (GORMAN et alii, 1984a). Além disso, a resistência varia se o esporo estiver seco ou em suspensão (LEVINE, 1952).

QUADRO 3 - Reduções decimais do número dos esporos de *B. subtilis* dos lotes A, B, C, D e E após contato com o hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 e temperatura de 30°C).

Lote	Repetição	Tempo de contato (min)					
		60	90	120	140	160	180
A	1	0,20	0,92	2,62	3,20	3,83	4,43
	2	0,20	0,90	2,58	3,20	3,85	4,35
	3	0,15	0,86	1,70	3,06	3,31	4,28
B	1	0,34	0,67	2,24	2,82	3,10	4,18
	2	0,25	0,61	2,34	3,12	3,32	3,92
	3	0,26	0,76	2,42	3,19	3,36	3,92
C	1	0,21	1,07	2,33	2,94	3,34	4,26
	2	0,22	1,06	2,38	2,90	3,05	4,10
	3	0,11	0,96	2,23	2,83	4,08	4,52
D	1	0,24	0,71	1,93	3,05	3,30	4,74
	2	0,22	0,49	1,88	2,75	3,04	4,54
	3	0,10	0,44	1,88	2,66	3,04	4,43
E	1	0,20	1,15	2,09	2,71	3,21	4,29
	2	0,17	0,94	2,12	2,83	3,41	4,21
	3	0,13	0,77	2,07	2,65	3,17	4,30

QUADRO 4 - Reduções decimais do número dos esporos de *B. subtilis* dos lotes F, G, H, I e J após contato com o hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 e temperatura de 30°C).

Lote	Repetição	Tempo de contato (min)					
		60	90	120	140	160	180
F	1	0,38	0,50	1,79	3,02	3,55	4,34
	2	0,26	0,53	1,78	2,98	3,39	4,17
	3	0,28	0,45	1,81	2,91	3,39	4,46
G	1	0,15	0,72	2,18	3,12	3,52	4,31
	2	0,14	0,74	2,25	3,01	3,36	4,03
	3	0,21	0,61	2,32	3,22	3,73	4,39
H	1	0,20	0,94	2,37	2,97	3,69	--
	2	0,15	1,09	2,37	2,95	3,69	--
	3	0,10	0,94	2,36	2,97	3,62	--
I	1	0,16	0,86	1,98	2,57	3,58	4,58
	2	0,18	0,95	2,01	3,82	3,73	4,22
	3	0,01	0,32	1,96	2,53	3,48	4,77
J	1	0,30	1,06	2,33	3,09	3,47	4,28
	2	0,24	1,10	2,42	3,11	3,42	3,97
	3	0,28	0,97	2,39	3,11	3,58	3,93

QUADRO 5 - Análise de variância das reduções decimais do número de esporos de B. subtilis dos lotes A, B, C, D, E, F, G, H, I e J recém-preparados, após contato (60, 90, 120, 140, 160 e 180 minutos) com o hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 e temperatura de 30°C).

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Lotes de esporos (L)	9	1,1117	0,1235	2,28 ns
Resíduo (a)	20	1,0817	0,0541	
Tempo de contato (TC)	5	359,8598	71,9720	9,05*
Interação (L*TC)	45	3,5630	0,0792	
Resíduo (b)	97	771,6417	7,9551	
Total	176	1137,2579		
Coeficiente de variação				10%

ns - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05).

* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05).

Por isto, neste experimento procurou-se minimizar a influência desses fatores. Assim, com relação aos microrganismos, foram escolhidos os esporos de *B. subtilis* ATCC 19659. Estes esporos apresentam características desejáveis como avaliadores da eficiência esporicida das soluções cloradas. Eles crescem em condições aeróbias, não são patogênicos e não apresentam nenhuma dificuldade na produção, recuperação e estocagem que são algumas das características que se procura num indicador biológico (HOXEY, 1985). Também por serem aeróbios, os esporos de *B. subtilis* ATCC 19659 são mais resistentes à ação dos compostos clorados do que os anaeróbios (DYE e HEAD, 1972; ODLAUG & PFLUG, 1976; ODLAUG, 1981; FOEGEDING, 1983), à exceção do dióxido de cloro (FOEGEDING, 1983; FOEGEDING et alii, 1986). Além disso, esse esporo é um dos indicados no método descrito pela AOAC para avaliar a ação esporicida de agentes químicos (ENGLER, 1984).

Também a técnica de preparo e obtenção dos esporos de *B. subtilis* foi a mesma para cada um dos lotes produzidos.

Um outro fator controlado foi a intensidade da ação das soluções cloradas. Para isso, usou-se o hipoclorito de sódio, composto clorado amplamente aceito nas indústrias de alimentos, na concentração próxima de 100 mg/l de cloro disponível livre recomendada para o procedimento de sanificação de superfícies (LEITAO, 1976; BANWART, 1980; FOEGEDING, 1983; BRASIL, 1984; LOPES, 1986). As recomendações para uso das soluções cloradas geralmente não indicam o pH. Por isso, no experimento, optou-se por 9,8 que é um valor de pH próximo

daquele das soluções de hipoclorito de sódio em concentrações de 100 mg/l de cloro disponível.

Em síntese, os resultados permitem concluir que é possível se obter lotes de esporos de *B. subtilis*, produzidos em tempos diferentes, que apresentem uma mesma resistência à ação do cloro. Para atingir esse objetivo, é fundamental que todas as condições de esporulação sejam padronizadas.

Por outro lado, em função da análise de variância do Quadro 5 obtém-se, a partir de todos os pontos experimentais dos Quadros 3 e 4, uma regressão linear ($P < 0,05$) para todos os lotes: $Y = 0,0351X - 2,073$, onde Y representa reduções decimais e X os tempos de contato, em minutos, do esporo com o sanificante. Esta regressão apresenta um r^2 de 0,95 e, por isso, pode-se afirmar que 95% da variação das reduções decimais do número de esporos de *B. subtilis* é explicada pela variação no tempo de contato com o cloro.

Constata-se pela regressão e pela sua representação gráfica (Figura 4) a existência de um período inicial em que o contato do cloro com os esporos não reduziu, em níveis consideráveis, o número dos microrganismos. Isso é facilmente notado, pois a curva de destruição que a regressão descreve, intercepta o eixo referente ao tempo de contato num ponto fora do zero.

Essa resistência dos esporos à ação do cloro, verificada no início do tratamento, provoca um desvio da forma logarítmica da curva de destruição (CERF, 1977) que passa a

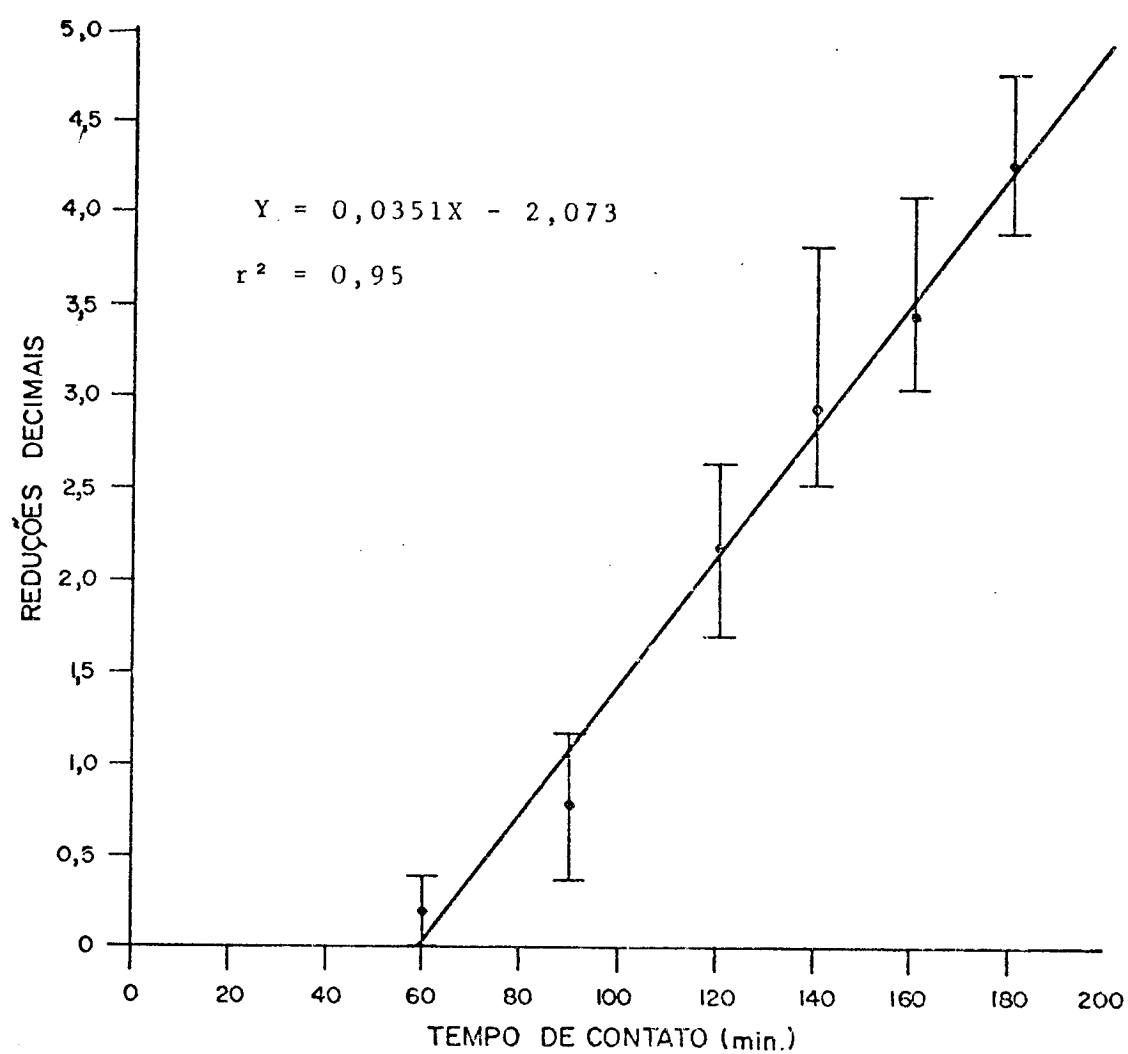


FIGURA 4 - Regressão linear das reduções decimais do número dos esporos de B. subtilis após contato com o hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 e temperatura de 30°C).

apresentar uma fase lag. Este desvio tem sido observado para diversos compostos clorados e é consequência da resistência à ação desses agentes químicos que a cobertura confere aos esporos bacterianos (JONES Jr. et alii, 1968; DYE & HEAD, 1972; WANG et alii, 1973; WYAT & WAITES, 1973 e 1975; KULIKOWSKY et alii, 1975; GORKANN et alii, 1983; FOEGEDING et alii, 1986). Porém, a fase lag tende a desaparecer à medida que as soluções cloradas se tornam mais concentradas (JONES Jr. et alii, 1968; FOEGEDING et alii, 1986).

A partir dessas observações e da regressão linear foi possível obterem-se parâmetros importantes para se avaliar a ação do cloro sobre os esporos de B. subtilis: o tempo de início de morte e o valor D. O tempo de início de morte é uma estimativa da fase lag já mencionada e o valor D é o tempo necessário para que a solução clorada, nas condições experimentais avaliadas, reduza o número de esporos em 90% - equivalente a 1 redução decimal - e é obtido da parte da curva de destruição onde a morte dos esporos é logarítmica (WANG et alii, 1973).

Assim, o tempo de início de morte e o valor D dos esporos de B. subtilis podem ser determinados a partir da equação obtida ($Y = 0,0351X - 2,073$). O tempo de início de morte é aquele estimado no momento em que a reta descrita pela regressão intercepta o eixo relativo ao tempo de contato. No ponto de intercessão o valor de redução decimal (Y) é zero. Já o valor D é estimado pela diferença entre os tempos necessários para se

obterem reduções decimais consecutivas ou pelo inverso da inclinação da reta descrita pela regressão.

No experimento, o tempo de início de morte dos esporos de B. subtilis foi de 59,06 minutos enquanto o valor D foi de 28,49 minutos. É importante salientar que resultados muito próximos aos mencionados são encontrados quando se aplicam aos dados experimentais as fórmulas empíricas para se avaliar a ação do calor, propostas por HAYAKAWA (1982).

O Quadro 6 mostra as equações de regressão e o Quadro 7 relaciona os tempos de início de morte e os valores D para os esporos de B. subtilis de cada um dos lotes avaliados. Observa-se que os tempos de início de morte ficaram entre 64,86 minutos para o lote D e 52,05 minutos para o lote J. Os valores D apresentaram uma variação entre 30,58 e 26,38 minutos relativos aos lotes J e I, respectivamente.

Por outro lado, verifica-se que a regressão representativa de todos os lotes avaliados ($Y = 0,0351X - 2,073$) estima com bastante precisão, ao comparar-se com os resultados experimentais, a redução do número de esporos de B. subtilis. Assim, observa-se no Quadro 8 que as reduções decimais médias de todos os valores experimentais e os calculados pela regressão são praticamente iguais para 120, 140, 160 e 180 minutos de contato entre o cloro e os esporos. As reduções experimentais e as calculadas são, respectivamente, 2,19 e 2,14 para 120 minutos; 2,95 e 2,84 para 140; 3,45 e 3,54 para 160 e 4,29 e 4,25 para 180 minutos. Porém, para os tempos de contato de 60 e 90 minutos há

QUADRO 6 - Equações de regressão linear das reduções decimais do número de esporos de *B. subtilis* nos diversos lotes recém-preparados, após contato com o hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 e temperatura de 30°C).

Lotes dos esporos	Equações de regressão*	Valores de r^2
A	$Y = 0,0362X - 2,102$	0,97
B	$Y = 0,0328X - 1,831$	0,96
C	$Y = 0,0344X - 1,934$	0,98
D	$Y = 0,0364X - 2,361$	0,96
E	$Y = 0,0337X - 1,965$	0,96
F	$Y = 0,0358X - 2,259$	0,97
G	$Y = 0,0359X - 2,160$	0,99
H	$Y = 0,0361X - 2,086$	0,96
I	$Y = 0,0379X - 2,418$	0,95
J	$Y = 0,0327X - 1,702$	0,98

* - Todos os coeficientes de X são significativos ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

QUADRO 7 - Valores do tempo de início de morte e valores D, obtidos das equações das regressões, dos esporos de B. subtilis dos diversos lotes após contato com o hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 e temperatura de 30°C).

Lotes dos	Tempos de início	Valores D
esporos	de morte (min)	(min)
A	58,07	27,62
B	55,82	30,49
C	56,22	29,07
D	64,86	27,48
E	58,31	29,67
F	63,10	27,93
G	60,17	27,85
H	57,78	27,70
I	63,80	30,58
J	52,05	30,58

QUADRO 8 - Reduções decimais experimentais (RDE) do número de esporos de *E. subtilis* após contato com o hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 e temperatura de 30°C) e reduções decimais obtidas pela regressão (RDR), $Y = 0,351X - 2,073$.

=====		
Tempo de contato	RDE	RDR
(min)		
=====		
60	0,20	0,03
90	0,80	1,09
120	2,19	2,14
140	2,95	2,84
160	3,45	3,54
180	4,29	4,25
=====		

uma considerável diferença. Nestes casos as reduções decimais experimentais são, respectivamente, 0,20 e 0,80 e as calculadas 0,03 e 1,09.

Além disso, a regressão obtida, sem levar em consideração os lotes ($Y = 0,0351X - 2,073$), foi importante para se determinarem as condições para os demais experimentos. Assim, foi a partir dela que se estabeleceram o tempo de início de morte (59,06 minutos) e o valor D (28,49 minutos) usados no experimento que avalia o efeito da concentração e do pH na eficiência das soluções cloradas sobre os esporos de B. subtilis. Também, foi através dessa regressão linear que se determinou o tempo de contato de 145 minutos entre o cloro e os esporos usado no experimento de avaliação da estabilidade da resistência dos esporos à ação do cloro durante o armazenamento.

A opção por esse tempo de contato (145 minutos) fundamentou-se na análise do Quadro 8. Ele corresponde ao tempo necessário para se obterem 3 reduções decimais no número de esporos de B. subtilis. Este índice encontra-se dentro da faixa de morte logarítmica dos esporos onde os valores calculados são muito próximos dos experimentais. Também, é um índice de redução que se localiza num ponto da curva de destruição afastado da fase lag ou da cauda. Além disso, a redução de 99,9% (3 reduções decimais) diminui o número inicial dos esporos na suspensão próximo de 10^9 UFC/ml para valores em torno de 10^6 UFC/ml que são facilmente enumerados pelo plaqueamento das diluições 10^{-4} ou 10^{-5} .

4.2. ESTABILIDADE DO NÚMERO DE ESPOROS DE *B. subtilis* E DE SUA RESISTÊNCIA AO HIPOCLORITO DE SÓDIO DURANTE O ARMAZENAMENTO

O tipo de armazenamento (refrigerados a 4°C, congelados a -18°C e liofilizados/4°C) e também o período (Tempo 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias) apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$) quando se avaliaram os logaritmos decimais dos números de esporos nos lotes R, S e T (Quadros 9 e 10).

No entanto, sob o ponto de vista prático, qualquer tipo de armazenamento pode ser considerado adequado pois o objetivo de manter o número de esporos dos lotes avaliados em torno de 10^9 UFC/ml foi atingido. Constata-se, pelo Quadro 11, que as médias dos números dos esporos liofilizados, refrigerados e congelados foram, respectivamente, 1,51, 1,48 e $1,32 \times 10^9$ UFC/ml.

Já com relação ao período de armazenamento verifica-se que há diferenças detectadas nos logaritmos decimais do número de esporos de *B. subtilis* sob congelamento e liofilizados (Quadro 10). Essa diferença não foi constatada para os esporos refrigerados a 4°C cujos números permaneceram entre 1,41 e $1,58 \times 10^9$ UFC/ml no período de armazenamento de 180 dias (Quadro 12). Quanto aos esporos congelados a -18°C observou-se uma tendência de aumento do número de esporos viáveis à medida que se prolongou o armazenamento. Este aumento fica caracterizado principalmente nas avaliações dos períodos de 150 e 180 dias

QUADRO 9 - Logaritmo decimal do número de esporos de B. subtilis dos lotes R, S e T armazenados sob diferentes tipos e períodos.

Tipo de armazenamento	Período de armazenamento (dias)	Logaritmo decimal		
		Lote R	Lote S	Lote T
4°C em glicerol e água (15 : 85)	Tempo 0	9,14	9,27	9,14
	30	9,17	9,14	9,17
	60	9,10	9,12	9,23
	90	9,14	9,18	9,19
	120	9,21	9,16	9,18
	150	9,18	9,16	9,16
	180	9,17	9,19	9,24
-18°C em glicerol e água (15 : 85)	Tempo 0	8,99	8,96	9,01
	30	9,05	9,10	9,04
	60	9,14	9,12	9,10
	90	9,14	9,16	9,04
	120	9,16	9,16	9,09
	150	9,17	9,25	9,25
	180	9,15	9,20	9,29
continua...				

Continuação Quadro 9.

	Tempo 0	9,23	9,33	9,26
	30	9,01	9,16	9,08
liofilizados/4°C	60	9,21	9,20	9,16
em tampão fosfato	90	9,20	9,23	9,20
M/15, pH 7,0	120	9,06	9,20	9,16
	150	9,12	9,26	9,18
	180	9,12	9,17	9,15

QUADRO 10 - Análise de variância do logaritmo decimal do número de esporos de *B. subtilis* armazenados sob diferentes tipos [a 4°C e a -18°C suspensos em glicerol e água (15 : 85) e a 4°C liofilizados em tampão fosfato M/15, pH 7,0] e períodos (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias).

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tipo de armazenamento	2	0,0381	0,0190	8,26%
Período de armazenamento/4°C	6	0,0051	0,0008	0,35ns
Período de armazenamento/-18°C	6	0,1220	0,0203	8,84%
Período de armazenamento/4°C L	6	0,0650	0,0108	4,69%
Resíduo	42	0,0973	0,0023	
Total	62	0,3275		
Coeficiente de variação				0,52%

ns - Não significativo ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05).

* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05).

QUADRO 11 - Médias do logaritmo decimal do número de esporos de B. subtilis armazenados sob diferentes tipos.

Tipo de armazenamento	UFC/ml (x 10 ⁹)	Logaritmo decimal
Liofilizados/4°C	1,51	9,18
4°C	1,48	9,17
-18°C	1,32	9,12

QUADRO 12 - Número de esporos de B. subtilis armazenados sob diferentes tipos e períodos. Médias dos lotes R, S e T.

Período de armazenamento (dias)	Número de esporos UFC/ml ($\times 10^9$)		

	4°C	-18°C	liofilizados/4°C
=====			
Tempo 0.	1,51	0,98	1,86
30	1,45	1,15	1,20
60	1,41	1,32	1,55
90	1,48	1,29	1,62
120	1,51	1,38	1,38
150	1,48	1,66	1,55
180	1,58	1,62	1,41
=====			

quando o número inicial de $0,98 \times 10^9$ UFC/ml atinge, respectivamente, $1,66$ e $1,62 \times 10^9$ UFC/ml (Quadro 12). Verifica-se, também, que os números dos esporos liofilizados apresentaram como característica uma maior variação nos diversos períodos de armazenamento particularmente se comparados àqueles sob refrigeração. O número dos esporos liofilizados variou entre $1,20$ e $1,86 \times 10^9$ UFC/ml nos períodos de armazenagem avaliados. Foram os períodos de 30, 120 e 180 dias que apresentaram número de esporos mais baixos (Quadro 12).

A tendência de aumento do número de esporos viáveis com armazenagem sob congelamento pode ser explicada. Normalmente, uma parte dos esporos de uma suspensão não germina e permanece com estado de dormência dependendo das condições experimentais em que são enumerados (BAYLLIS et alii, 1981). Uma maior ou menor germinação depende, entre outros fatores, da forma de ativação dos esporos que constitui a primeira etapa de suas conversões em células vegetativas (BLOCHER & BUSTA, 1983; COOK & PIERSON, 1983; SNEATH, 1986). A ativação pode não apresentar alterações nas propriedades dos esporos mas, na maioria das vezes, é indispensável para ocorrência de germinação. Por outro lado, sabe-se que a idade (COOK & PIERSON, 1983; SNEATH, 1986) e também o armazenamento a baixas temperaturas (COOK & PIERSON, 1983) contribuem para ativação de esporos dormentes, aumentando o número de esporos germinados. Fundamentado nestas observações, é razoável supor que o congelamento a -18°C associado ao período de armazenamento (idade dos esporos) poderia estar ativando esporos

que antes permaneciam em dormência e, por não germinarem, não foram enumerados nas condições experimentais utilizadas.

Por outro lado, a maior variação do número de esporos viáveis com armazenagem sob liofilização, quando comparados aos refrigerados, pode ser objeto de especulação. Deve-se considerar que os esporos liofilizados são muito mais manuseados: além de receberem o tratamento de liofilização que podem afetá-los de forma diferenciada, dependendo do estado fisiológico em que se encontram, eles necessitam de uma ressuspensão em água destilada ou solução tampão apropriada antes de se executar o procedimento de contagem em condições experimentais adequadas. Sem dúvida, este maior manuseio pode implicar em variações no número de esporos viáveis.

Também o tipo e o período de armazenamento apresentaram diferenças significativas ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$), quando se avaliaram as reduções decimais dos números dos esporos de *E. subtilis* submetidos às soluções com 105 mg/l de cloro disponível livre, em pH 9,8 e tempo de contato de 145 minutos a 30 °C (Quadros 13 e 14).

A média das reduções decimais dos números dos esporos armazenados sob congelamento e liofilizados foi maior do que aqueles sob refrigeração (Quadro 15). Verifica-se, pelo Quadro 13, que foram os períodos de armazenamento de 150 e 180 dias para os esporos congelados e os de 120, 150 e 180 dias para os liofilizados que causaram esta diferença na média por apresentarem reduções decimais mais elevadas.

QUADRO 13 - Reduções decimais dos números dos esporos de B. subtilis após serem submetidos à ação do hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre, pH 9,8 e tempo de contato de 145 minutos a 30°C).

Tipo de armazenamento	Período de armazenamento (dias)	Reduções decimais		
		Lote R	Lote S	Lote T
4°C em glicerol e água (15 : 85)	Tempo 0	2,80	2,60	2,53
	30	2,74	2,48	2,65
	60	2,77	2,73	2,51
	90	2,89	2,46	2,57
	120	2,80	2,62	2,62
	150	2,83	2,73	2,52
	180	3,50	3,46	3,57
-18°C em glicerol e água (15 : 85)	Tempo 0	2,62	2,55	2,79
	30	2,55	2,67	2,71
	60	2,79	2,50	2,82
	90	2,82	2,97	2,35
	120	2,49	2,65	3,01
	150	> 5,17	> 5,25	> 5,25
	180	> 5,15	> 5,20	> 5,29
continua...				

Continuação Quadro 13.

	Tempo 0	2,71	2,82	2,86
	30	2,92	3,06	2,96
liofilizados/4°C	60	2,77	2,82	2,80
em tampão fosfato	90	2,23	2,97	2,68
H/15, pH 7,0	120	3,83	3,44	3,56
	150	> 5,12	> 5,26	> 5,18
	180	> 5,12	> 5,17	> 5,15

QUADRO 14 - Análise de variância das reduções decimais dos números dos esporos de B. subtilis após serem submetidos ao hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre, pH 9,8 e tempo de contato de 145 minutos a 30°C) e armazenados sob diferentes tipos (4°C, -18°C e liofilizados/4°C) e períodos (0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias).

F.V.	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tipo de armazenamento	2	7,6213	3,8106	138,6*
Período de armazenamento/4°C	6	1,6760	0,3127	11,37*
Período de armazenamento/-18°C	6	27,4978	4,5830	166,65*
Período de armazenamento/4°C L	6	22,5954	3,7659	136,94*
Resíduo	42	1,1560	0,0275	
Total	62	60,7465		
Coeficiente de variação				5,09%

* Significativo ao nível de 5% de probabilidade ($P < 0,05$).

QUADRO 15 - Média das reduções decimais dos números dos esporos de *B. subtilis* após serem submetidos ao hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre, pH 9,8 e tempo de contato de 145 minutos a 30°C) e armazenados sob diferentes tipos.

===== Tipo de armazenamento =====	Reduções decimais =====
Liofilizados/4°C	3,59
- 18°C	3,41
4°C	2,78
=====	=====

Constata-se, também, que os esporos refrigerados a 4°C não alteraram sua resistência à ação do cloro por um período de 150 dias de armazenamento, mantendo-se numa faixa de 2,62 a 2,69 reduções decimais. Entretanto aos 180 dias de armazenagem esses esporos já apresentaram uma queda acentuada em sua resistência com as reduções decimais atingindo a níveis de 3,51 (QUADRO 16).

Já os esporos sob congelamento mantiveram a mesma resistência à ação do cloro por 120 dias de armazenamento, numa faixa entre 2,64 e 2,72 reduções decimais. A partir daí, esses esporos sofreram uma brusca perda de resistência quando as reduções decimais tornaram-se superiores a 5,0 (Quadro 16).

Os esporos liofilizados foram aqueles que mais rapidamente perderam a estabilidade da resistência ao cloro durante o armazenamento. A resistência ao cloro nessa condição de armazenamento permaneceu a mesma até 90 dias com as reduções decimais variando entre 2,63 e 2,98. Esses valores atingiram 3,61 aos 120 dias e aumentaram bruscamente para índices superiores a 5,0 reduções decimais após 150 e 180 dias de armazenamento (Quadro 16).

Essa queda acentuada de resistência dos esporos à ação do cloro a partir de determinados períodos de armazenagem, provavelmente se relaciona a alterações ocorridas na cobertura dos esporos aumentando sua permeabilidade ao agente químico. Sabe-se que a cobertura do esporo é a camada protetora contra a ação do cloro (WYATT & WAITES, 1973; KULIKOWSKY et alii, 1975;

QUADRO 16 - Médias das reduções decimais dos números dos esporos de B. subtilis após serem submetidos ao hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre, pH 9,8 e tempo de contato de 145 minutos a 30°C) e armazenados sob diferentes tipos e períodos.

Período de Armazenamento	4 °C	-18 °C	Liofilizados/4 °C
0	2,64	2,65	2,81
30	2,62	2,65	2,98
60	2,67	2,70	2,80
90	2,64	2,71	2,63
120	2,68	2,72	3,61
150	2,69	> 5,22	> 5,15
180	3,51	> 5,21	> 5,19

ODLAUG, 1981; FOEGEDING, 1983; FOEGEDING & BUSTA, 1983a; FOEGEDING et alii, 1986), assim como sua ausência e sua falta de integridade aumentam o efeito letal do esporicida (WYATT & WAITES, 1975; FOEGEDING et alii, 1986). Portanto, é possível supor que o envelhecimento (COOK & PIERSON, 1983; SNEATH, 1986) tenha contribuído para alterar a permeabilidade e a susceptibilidade dos esporos ao cloro. Os esporos congelados e os liofilizados, por receberem tratamentos adicionais que provocam mais injúrias, comparados aos refrigerados, tornaram-se mais rapidamente sensíveis ao agente químico.

Diante de todos os resultados, conclui-se que a melhor forma de armazenamento dos esporos de B. subtilis, nas condições avaliadas no experimento, quanto a estabilidade do número de esporos e da sua resistência ao cloro foi a refrigeração a 4°C. Nessa condição de armazenagem, além do número ter permanecido constante durante o período dos 180 dias avaliados, a resistência ao cloro ficou inalterada por 150 dias.

Entretanto, o uso das suspensões de esporos sob congelamento ou liofilizados é perfeitamente aceitável desde que os períodos de armazenagem sejam no máximo de 120 e 90 dias, respectivamente. Nesse caso, considera-se que as diferenças detectadas no número de esporos ocorridas nessas condições de armazenagem não sejam relevantes.

Finalmente, é bom salientar que os resultados aqui mencionados são compatíveis com os disponíveis na literatura. Apesar das diferentes condições experimentais dos vários pesqui-

sadores, considerando-se a metodologia, o indicador biológico e o agente esporicida avaliados, entre outros, as pesquisas têm demonstrado a estabilidade do número de esporos (MARSHAL, 1963; HARNULV et alii, 1977) e da sua resistência durante o armazenamento para alguns agentes esporicidas, como cloro (LEVINE, 1952), água oxigenada e ácido peracético (LEAPER, 1988), óxido de etileno (REICH, 1980) e calor (HARNULV et alii, 1977; ODLAUG et alii, 1981).

4.3. EFEITOS DAS VARIAÇÕES DA CONCENTRAÇÃO E DO pH DAS SOLUÇÕES DE HIPOCLORITO DE SÓDIO SOBRE OS ESPOROS DE *B. subtilis*

A partir das reduções decimais do número de esporos de *B. subtilis* mostrados nos Quadros de 17 a 23 foi possível determinarem-se as regressões lineares do tipo $Y = aX + b$, onde Y representa as reduções decimais e X os tempos de contato do cloro com os esporos para cada solução nas diversas concentrações e valores de pH (Quadro 24 e Figuras de 5 a 11).

Das regressões lineares obtiveram-se os tempos de início de morte e os valores D indicados no Quadro 25. Verifica-se ao compararem-se os resultados que os valores desses parâmetros diminuíram quando ocorreu um aumento da concentração ou uma diminuição do pH das soluções cloradas. Para as concentrações de 50, 75, 150 e 200 mg/l de cloro disponível livre em pH constante de 9,8 os tempos de início de morte foram, respectivamente, 134,95, 91,03, 49,28 e 36,01 minutos enquanto os valores D foram 46,30, 36,76, 16,37 e 9,89 minutos. Já as

QUADRO 17 - Reduções decimais do número dos esporos de E. subtilis dos lotes L, M e N após contato com hipoclorito de sódio (pH 9,8 e temperatura de 30°C) na concentração de 50 mg/l de cloro disponível livre.

Tempo	Lote L			Lote M			Lote N		
(min)	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R
140	0,19	0,21	0,23	0,18	0,22	0,18	0,42	0,21	0,16
180	0,51	0,69	0,72	0,81	0,58	0,42	0,68	0,79	0,34
220	2,23	2,43	2,19	1,76	1,56	1,45	2,23	2,30	2,35
240	--	--	--	2,91	2,73	2,44	--	--	--
260	2,46	2,97	2,70	--	--	--	2,60	2,39	2,40
290	3,28	3,22	3,27	3,38	3,26	3,39	3,23	3,17	3,30

QUADRO 18 - Reduções decimais do número dos esporos de E. subtilis dos lotes L, M e N após contato com o hipoclorito de sódio (pH 9,8 e temperatura de 30°C) na concentração de 75 mg/l de cloro disponível livre.

Tempo	Lote L			Lote M			Lote N		
(min)	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R
80	0,14	0,11	0,17	0,18	0,10	0,10	0,23	0,12	0,20
110	0,25	0,31	0,25	0,36	0,26	0,32	0,38	0,32	0,35
140	0,72	0,84	0,69	0,77	0,72	0,70	0,69	0,83	0,78
170	2,06	2,05	1,83	2,11	2,21	1,98	2,07	2,39	2,21
190	2,83	2,84	2,88	3,18	3,00	3,46	2,78	3,07	3,17
220	3,29	3,46	3,28	3,82	3,74	3,96	3,38	3,79	3,57

QUADRO 19 - Reduções decimais do número dos esporos de B. subtilis dos lotes L, M e N após contato com o hipoclorito de sódio (pH 9,8 e temperatura de 30°C) na concentração de 150 mg/l de cloro disponível livre.

Tempo	Lote L			Lote M			Lote N		
(min)	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R
50	0,13	0,11	0,22	0,14	0,12	0,14	0,16	0,17	0,11
65	1,00	0,84	0,96	0,62	0,53	0,58	0,68	0,55	0,56
80	2,44	2,45	2,37	1,74	1,68	1,72	2,04	1,62	1,41
95	3,05	3,36	3,40	2,69	2,92	2,83	3,34	3,10	1,95
110	3,90	4,04	4,02	3,50	3,56	3,45	--	--	--
120	--	--	--	4,24	4,22	4,06	4,06	4,19	4,19

QUADRO 20 - Reduções decimais do número dos esporos de B. subtilis dos lotes L, M e N após contato com o hipoclorito de sódio (pH 9,8 e temperatura de 30°C) na concentração de 200 mg/l de cloro disponível livre.

Tempo (min)	Lote L			Lote M			Lote N		
	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R
40	0,37	0,44	0,32	0,37	0,44	0,27	0,43	0,43	0,40
50	1,40	1,10	1,09	1,18	1,29	1,21	1,24	1,46	1,27
55	--	--	--	1,98	2,13	2,09	2,25	2,38	2,05
60	2,93	2,94	2,68	2,27	2,65	2,52	2,84	2,88	2,32
65	3,19	3,36	3,20	2,76	2,85	2,71	3,33	--	2,78
70	3,35	3,63	3,37	--	--	--	3,65	3,41	--
80	4,37	4,43	4,06	--	--	--	--	--	--

QUADRO 21 - Reduções decimais do número de B. subtilis sobreviventes dos lotes O, P e Q após contato com o hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre e temperatura de 30°C) em pH 9,0.

Tempo	Lote O			Lote P			Lote Q		
(min)	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R
10	0,09	0,06	0,16	0,12	0,14	0,14	0,17	0,15	0,18
15	0,42	0,29	0,36	0,40	0,39	0,38	0,36	0,31	0,32
20	1,37	1,33	1,31	2,03	2,06	2,07	1,92	1,78	1,62
25	2,51	2,45	2,60	2,87	2,83	2,95	2,18	2,70	2,69
30	3,54	3,22	3,38	3,50	3,41	3,52	3,56	3,61	3,64
35	3,94	4,11	3,96	4,33	4,00	4,08	4,31	4,28	4,26

QUADRO 22 - Reduções decimais do número de esporos de B. subtilis dos lotes O, P e Q após o contato com o hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre e temperatura de 30°C) em pH 8,0.

Tempo	Lote O			Lote P			Lote Q		
(min)	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R
1	0,27	0,27	0,21	0,08	0,10	0,08	0,29	0,16	0,24
2	0,87	0,80	0,99	0,71	0,75	0,81	1,23	1,30	1,34
3	2,46	2,33	2,66	2,57	2,04	2,63	3,77	3,41	3,34
4	3,47	3,23	3,47	3,57	3,16	3,54	4,15	4,08	4,03
5	3,78	3,86	3,62	4,40	4,11	3,86	4,64	4,64	4,74

QUADRO 23 - Reduções decimais do número dos esporos de E. subtilis dos lotes O, P e Q após contato com o hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre e temperatura de 30°C) em pH 7,0.

Tempo	Lote O			Lote P			Lote Q		
(seg)	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R	1a R	2a R	3a R
20	0,26	0,12	0,24	0,31	0,24	0,28	0,15	0,23	0,23
40	1,19	1,23	1,23	1,31	1,07	1,24	1,23	1,32	1,13
50	2,27	2,37	2,50	2,37	2,37	2,51	2,47	2,47	2,50
60	3,06	2,94	2,94	2,79	2,86	2,84	2,90	2,99	3,00
70	3,80	3,89	3,81	3,45	3,40	3,51	--	--	--
80	--	4,27	4,22	3,80	4,54	3,78	3,45	3,51	3,44

QUADRO 24 - Regressões lineares das reduções decimais do número dos esporos de *B. subtilis* em função das concentrações e dos valores de pH das soluções cloradas na temperatura de 30°C.

Concentração/pH (mg/l)	Regressões lineares*	r ²
50 / 9,8	Y = 0,0216X - 2,915**	0,94
75 / 9,8	Y = 0,0272X - 2,472	0,92
105 / 9,8	Y = 0,0351X - 2,073	0,95
150 / 9,8	Y = 0,0611X - 3,011	0,95
200 / 9,8	Y = 0,1036X - 3,731	0,96
105 / 9,0	Y = 0,1733X - 1,819	0,97
105 / 8,0	Y = 1,064X - 0,836	0,91
105 / 7,0	Y = 0,0648X - 1,077	0,95

* - Y = Reduções decimais.

X = Tempo de contato em minutos, exceto para 105 / 7,0, que é em segundos.

** - Coeficientes de X são significativos ao nível de 5% de probabilidade (P < 0,05).

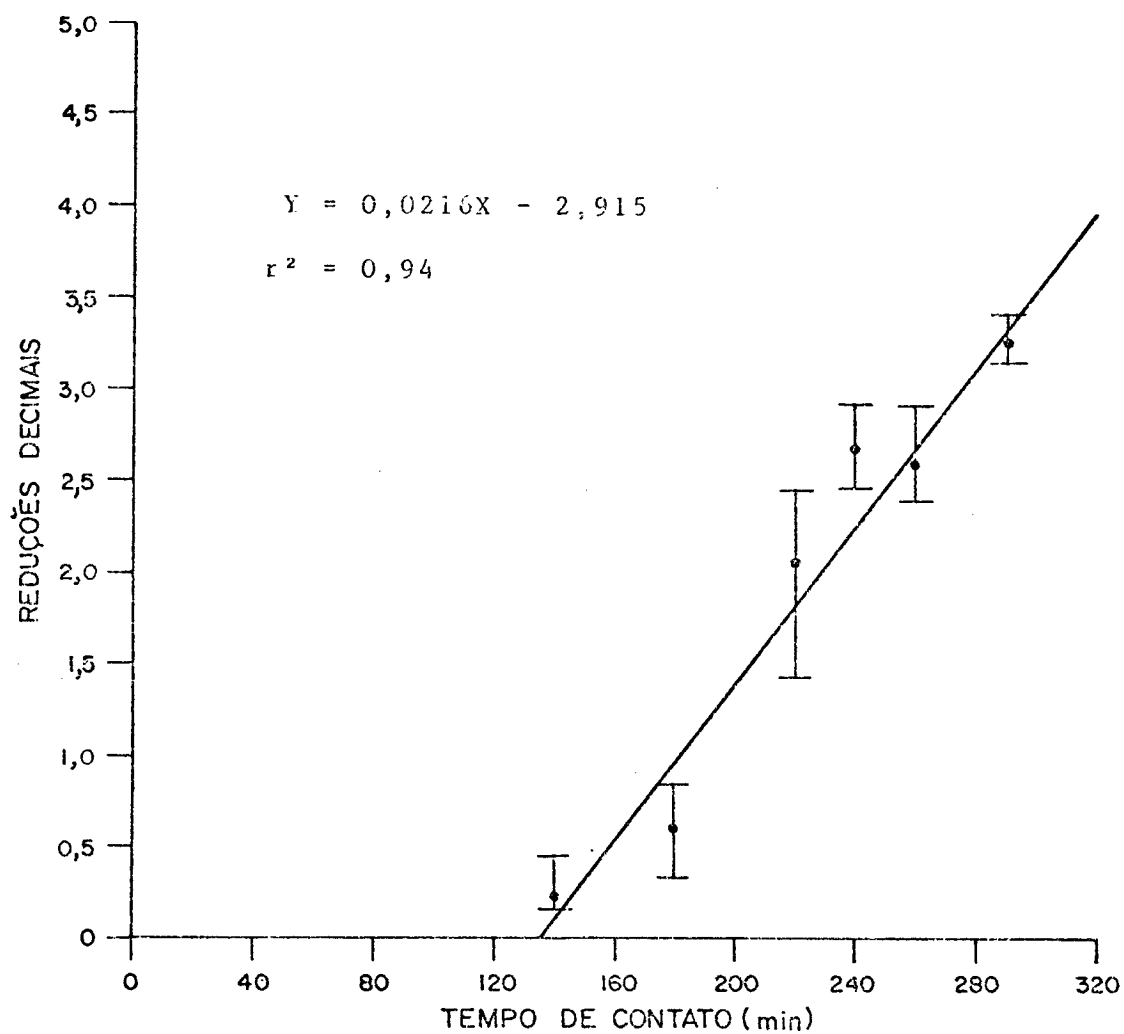


FIGURA 5 - Regressão linear das reduções decimais do número de esporos de *B. subtilis* após contato com o hipoclorito de sódio (pH 9,8 e temperatura de 30°C) na concentração de 50 mg/l de cloro disponível livre.

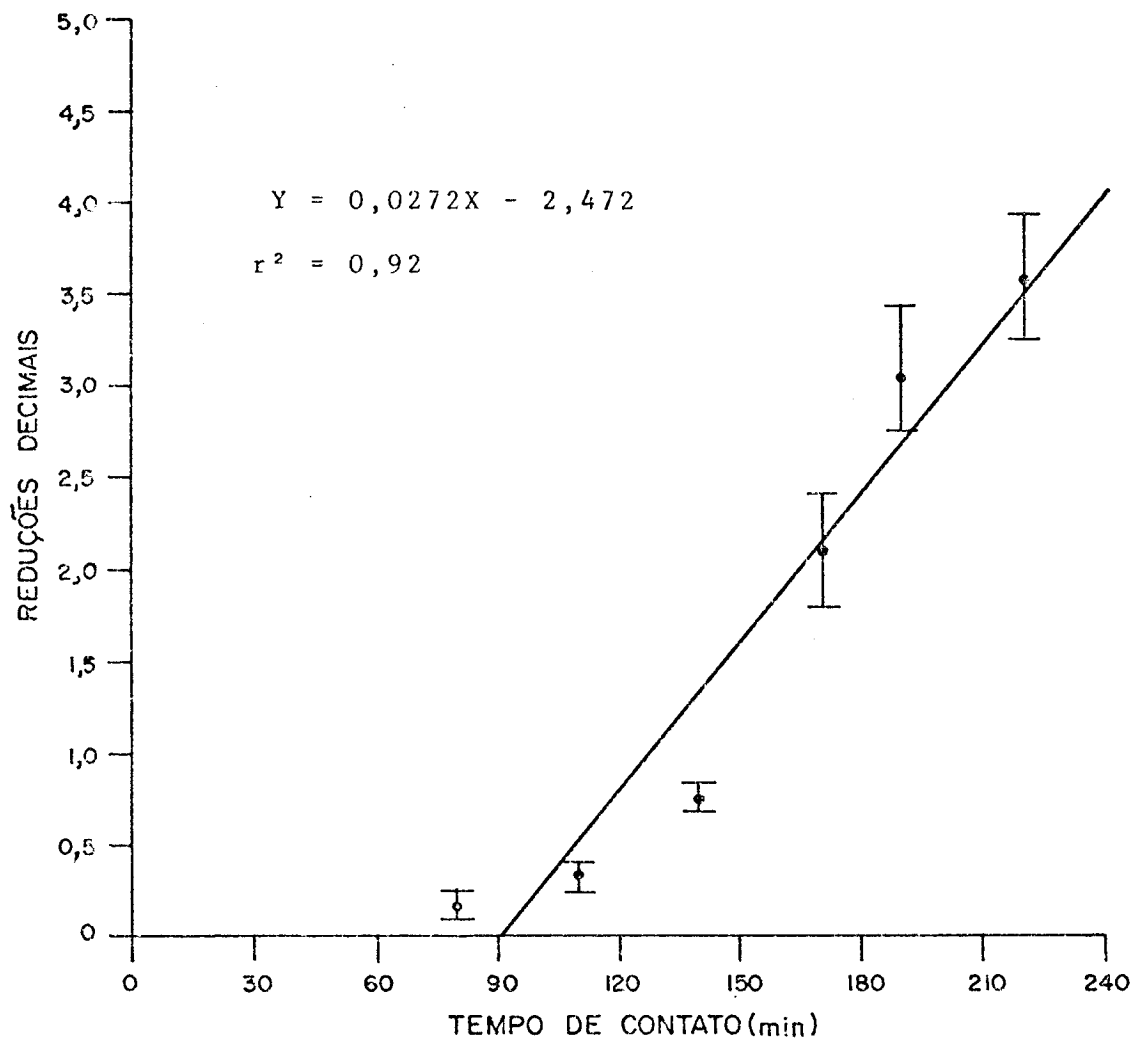
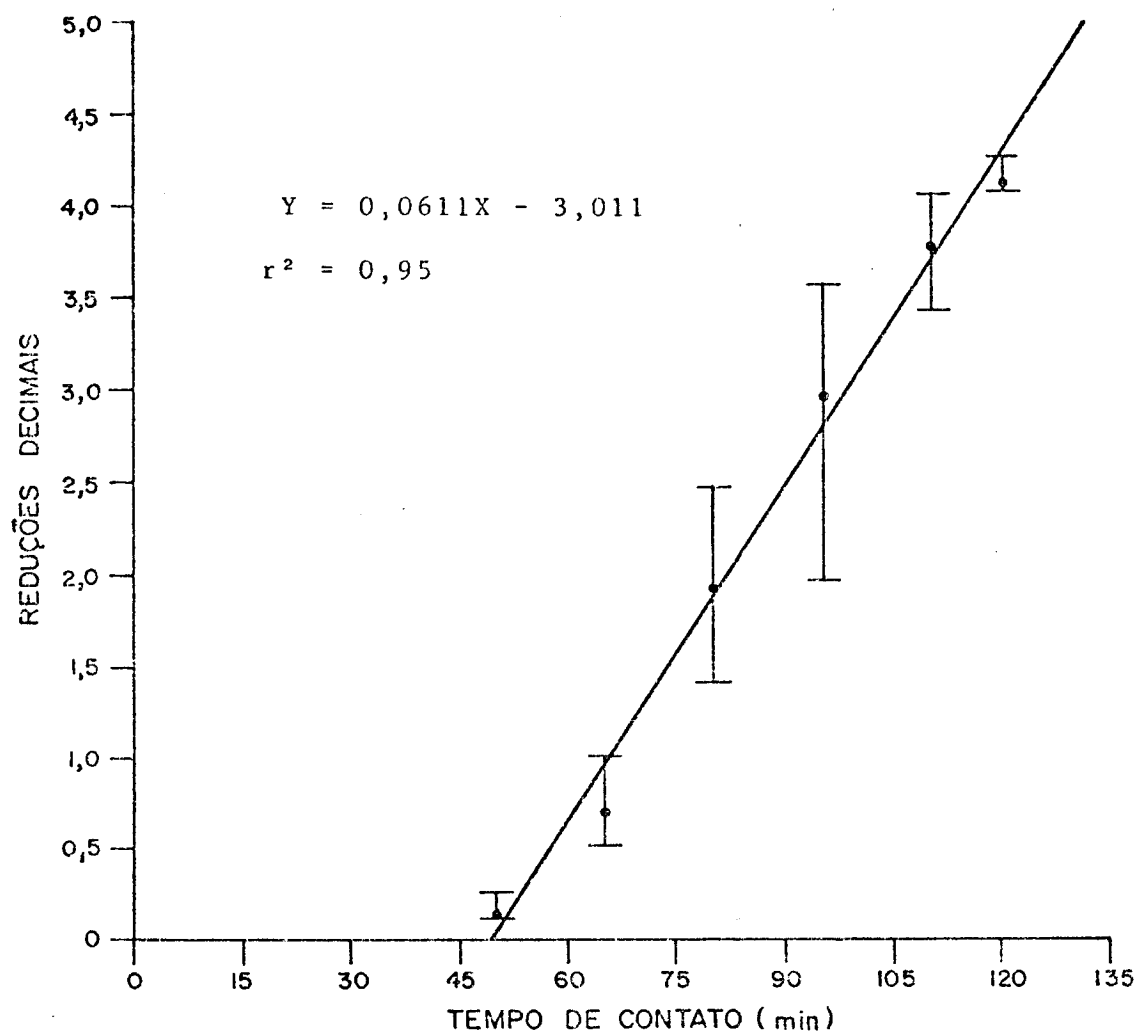
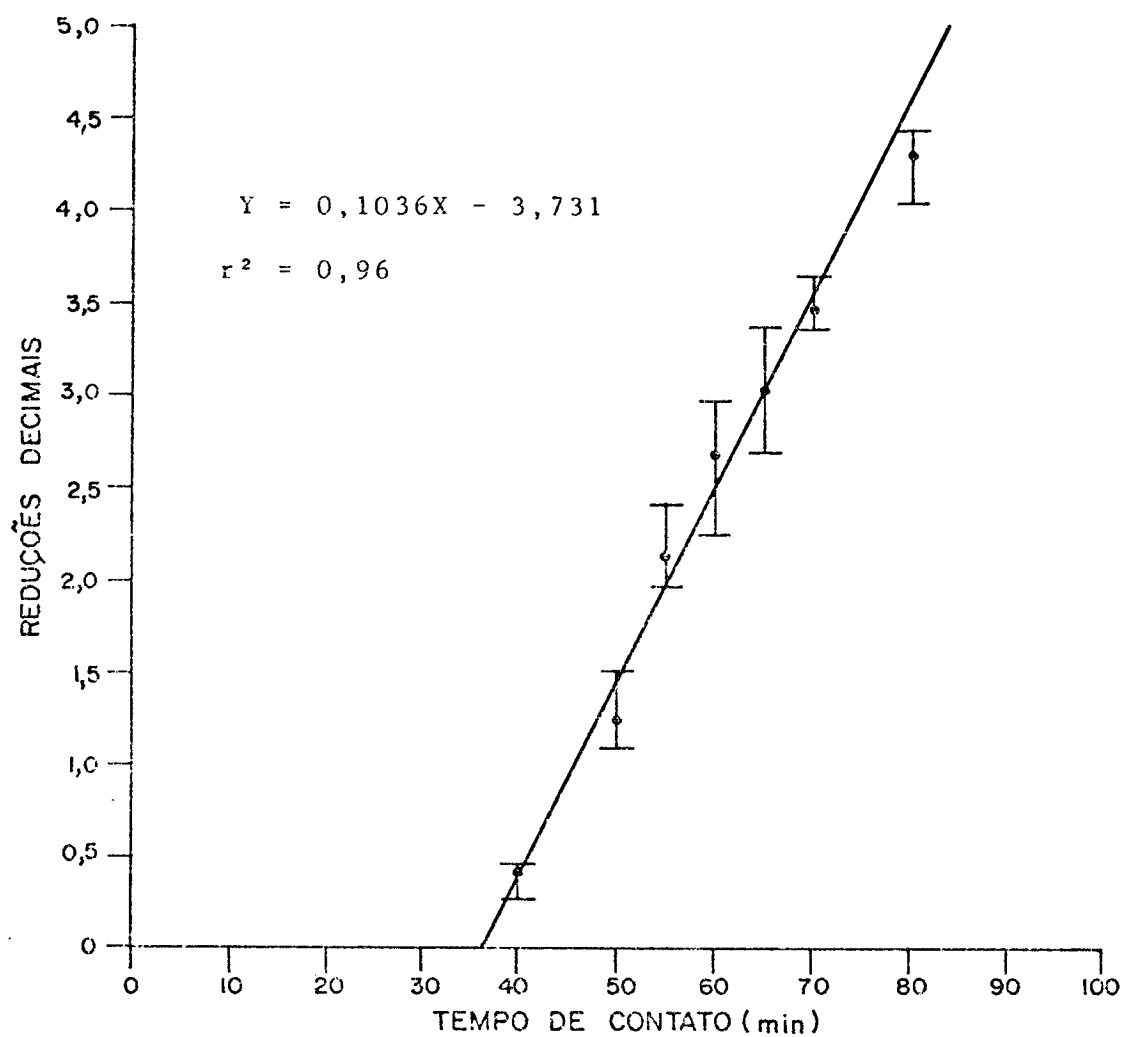


FIGURA 6 - Regressão linear das reduções decimais do número dos esporos de B. subtilis após contato com o hipoclorito de sódio (pH 9,8 e temperatura de 30°C) na concentração de 75 mg/l de cloro disponível livre.



IGURA 7 - Regressão linear das reduções decimais do número dos esporos de B. subtilis após contato com o hipoclorito de sódio (pH 9,8 e temperatura de 30°C) na concentração de 150 mg/l de cloro disponível livre.



GURA 8 - Regressão linear das reduções decimais do número dos esporos de B. subtilis após contato com o hipoclorito de sódio (pH 9,8 e temperatura de 30°C) na concentração de 200 mg/l de cloro disponível livre.

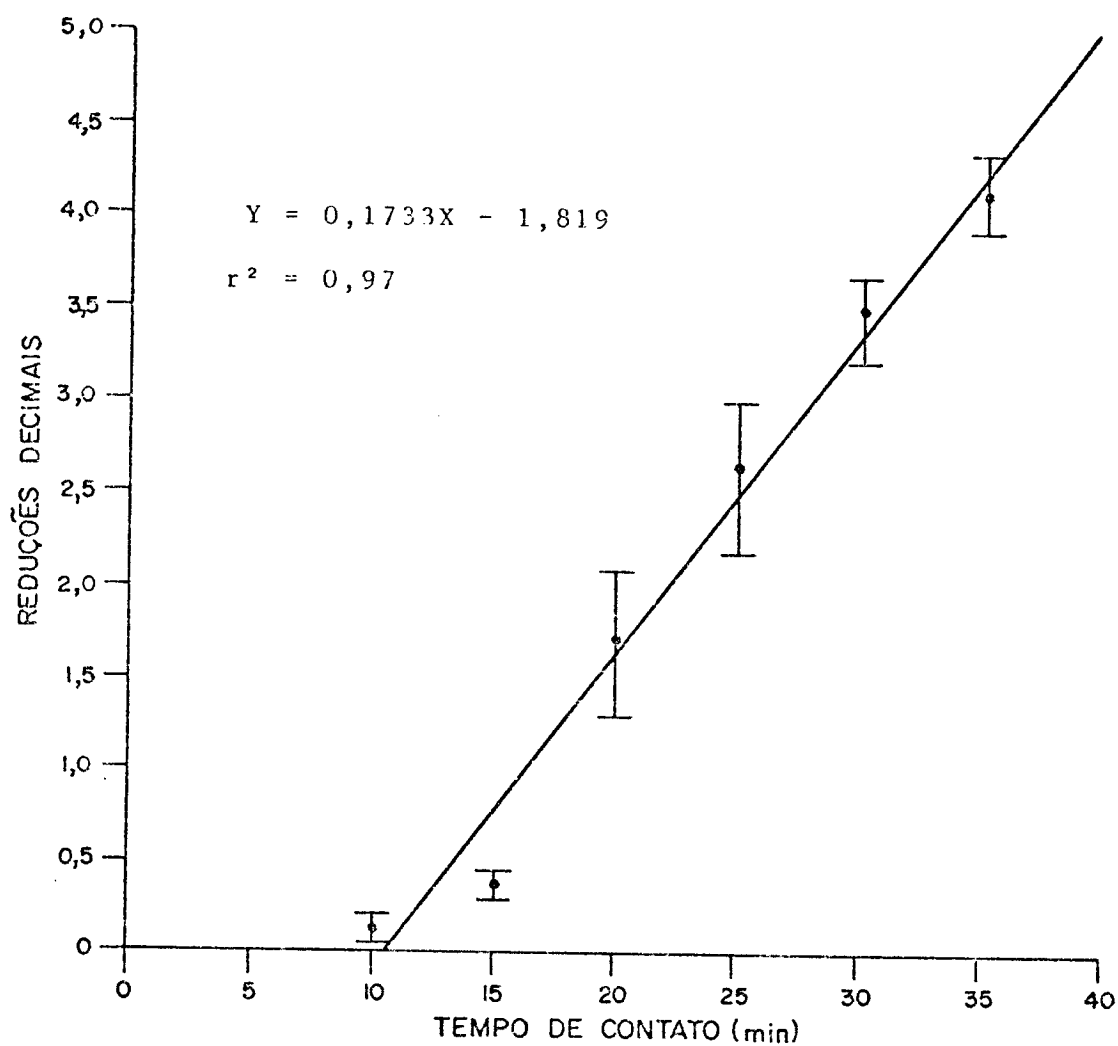
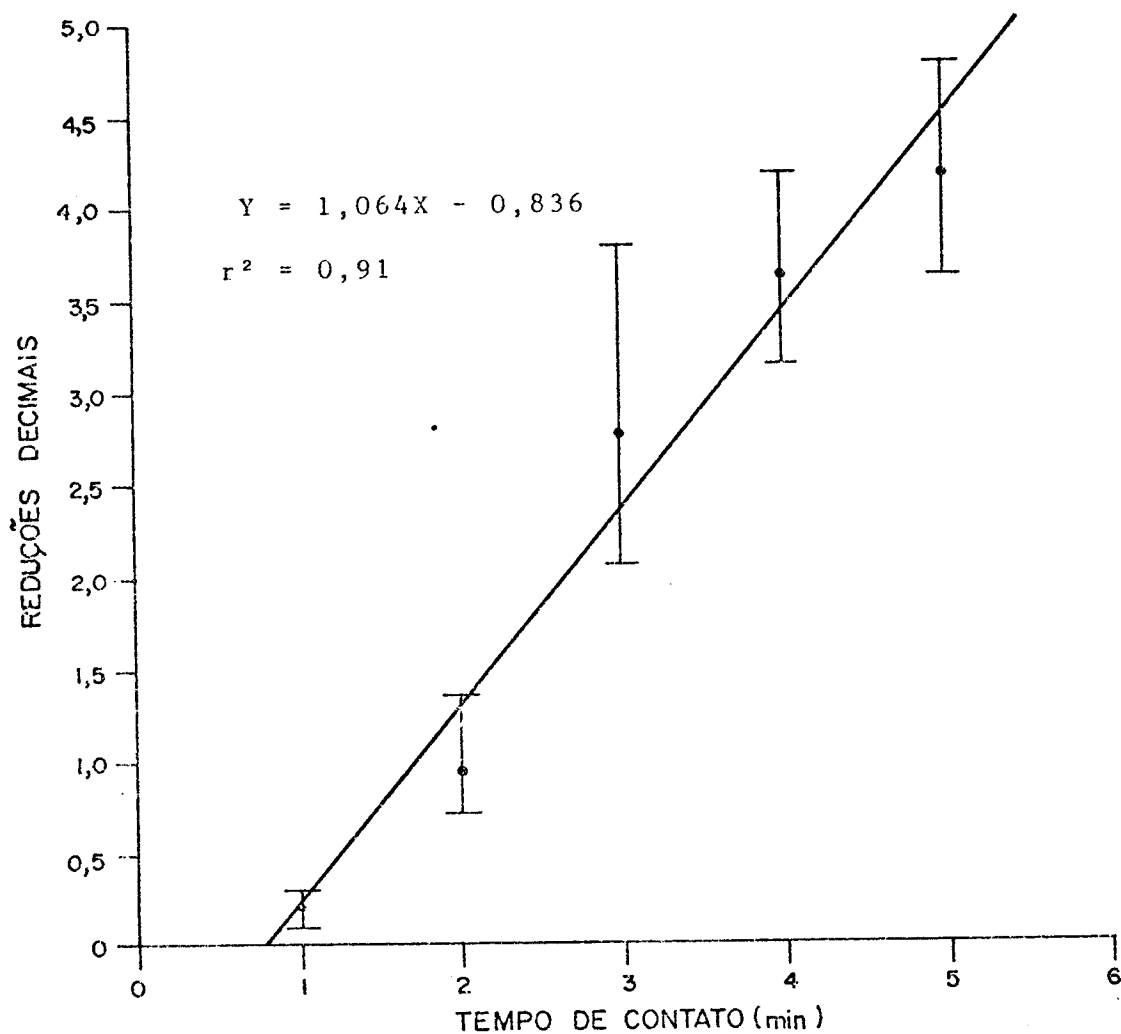


FIGURA 9 - Regressão linear das reduções decimais do número dos esporos de B. subtilis após contato com o hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre e temperatura de 30°C) em pH 9,0.



IGURA 10 - Regressão linear das reduções decimais do número dos esporos de *B. subtilis* após contato com o hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre e temperatura de 30°C) em pH 8,0.

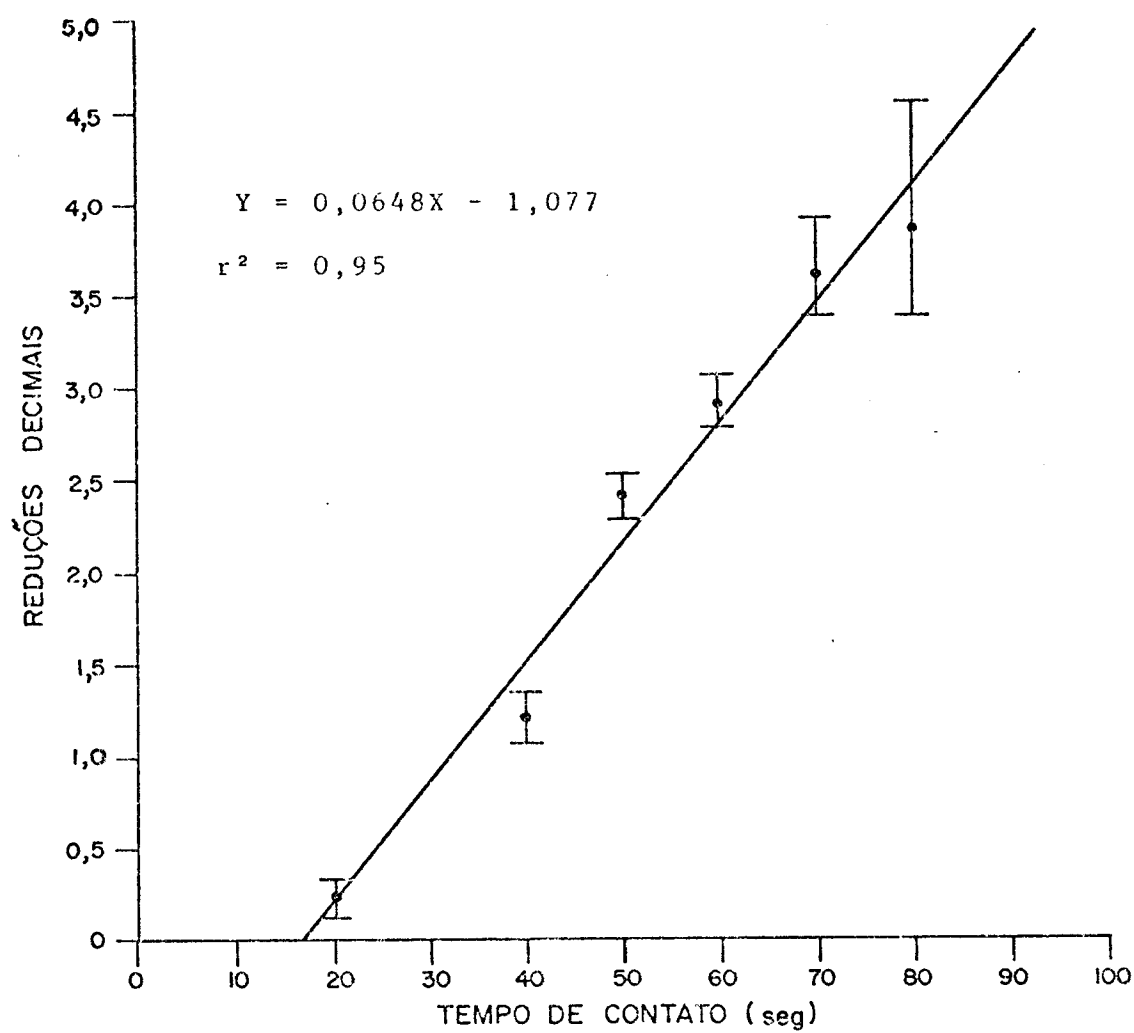


FIGURA 11 - Regressão linear das reduções decimais do número dos esporos de B. subtilis após contato com o hipoclorito de sódio, (105 mg/l de cloro disponível livre e temperatura de 30°C) em pH 7,0.

QUADRO 25 - Concentração em cloro disponível livre e o pH das soluções; concentração em ácido hipocloroso; tempos de início de morte e os valores D para os esporos de B. subtilis.

Cloro disponível/pH (mg/l)	Acido hipocloroso (mg/l)	Tempo de início de morte (min)	Valor D (min)
50 / 9,8	0,25	134,95	46,30
75 / 9,8	0,37	91,03	36,76
105 / 9,8	0,52	59,06	28,49
150 / 9,8	0,75	49,28	16,37
200 / 9,8	1,00	36,01	9,66
105 / 9,0	3,22	10,50	5,77
105 / 8,0	25,24	0,79	0,94
105 / 7,0	79,55	0,28	0,25

soluções com 105 mg/l de cloro disponível livre em valores de pH de 9,0, 8,0 e 7,0 apresentaram tempos de início de morte de 10,50, 0,79 e 0,28 minutos, respectivamente, enquanto os valores D foram de 5,77, 0,94 e 0,25 minutos.

Esses resultados, que mostram uma nítida diferença nos tempos de início de morte e também nos valores D são facilmente explicados. Inicialmente, pode-se afirmar que nesse experimento esses parâmetros são dependentes apenas da concentração e do pH das soluções cloradas, pois os demais fatores que influenciam na ação esporicida dessas soluções, como o tipo de microrganismo, presença ou não de matéria orgânica, tempo e temperatura de contato (ODLAUG, 1981; FOEGEDING, 1983) foram padronizadas. Com as condições experimentais sob controle, a análise se volta para as soluções cloradas. Sabe-se que o hipoclorito de sódio, assim como os demais compostos clorados, à exceção do dióxido de cloro (ODLAUG, 1981; FOEGEDING et alii, 1986) liberam em solução aquosa o ácido hipocloroso que apresenta ação esporicida pronunciada (TRUEMAN, 1971; ODLAUG & PFLUG, 1976; ODLAUG, 1981; FOEGEDING, 1983). Por outro lado, a concentração de ácido hipocloroso pode ser calculada a partir de um rearranjo da equação de Henderson-Hasselbalch que inter-relaciona a constante de dissociação do ácido hipocloroso ($pK_a = 7,50$, a 30 C), a concentração em cloro disponível livre e o pH das soluções:

$$\text{mg/l de HOCl} = \frac{\text{mg/l de cloro disponível livre}}{1 + 10^{\text{pH} - 7,50}} \quad (\text{equação 1})$$

Aqui, vale ressaltar que apenas a informação do teor de cloro disponível livre de uma solução, geralmente medido pelos métodos convencionais de titulação, é insuficiente para prever a eficiência esporicida. A expressão cloro disponível livre significa a soma das concentrações de ácido hipocloroso e do íon hipoclorito que estão em equilíbrio, em função do pH das soluções. Portanto, concentração de cloro disponível livre e o pH se relacionam intimamente e em conjunto determinam a quantidade de ácido hipocloroso disponível para destruição dos esporos. Verifica-se, pela equação acima, que as soluções de pH igual ao pK_a (7,50) têm 50% de suas concentrações de cloro disponível livre na forma de ácido hipocloroso. Já em soluções com pH abaixo de pK_a há predominância de ácido hipocloroso e o inverso ocorre naquelas de pH acima do pK_a , onde o íon hipoclorito está em concentrações mais elevadas.

Assim, a equação 1, adaptada de BLOCHER & BUSTA (1983), permite explicar os efeitos da concentração e do pH observados no experimento. Quando se aumentou a concentração de 50 até 200 mg/l de cloro disponível livre, mantendo-se o pH constante, houve uma correspondente elevação nos níveis de ácido hipocloroso, pois aumentou-se o numerador da equação. Já uma diminuição do pH da solução com 105 mg/l de cloro disponível livre para 9,0, 8,0 e 7,0 resultou num menor denominador, conseqüentemente as soluções também tiveram maiores teores de ácido hipocloroso e portanto maiores eficiências esporicidas.

A partir da equação 1 determinaram-se os teores de ácido hipocloroso nas soluções avaliadas. Esses valores são 0,25, 0,37, 0,52, 0,75, 1,00, 3,22, 25,24 e 79,55 para as soluções cloradas com 50, 75, 105, 150 e 200 mg/l de cloro disponível livre em pH 9,8 e naquelas com 105 mg/l em pH 9,0, 8,0 e 7,0 (Quadro 25). Nesse Quadro é facilmente perceptível, ainda, a associação entre os teores de ácido hipocloroso com os tempos de início de morte e os valores D. Verifica-se, por exemplo, que na concentração de 79,55 mg/l de ácido hipocloroso, o tempo de início de morte e o valor D são inferiores a 1 minuto, respectivamente, 0,28 e 0,25 minutos. Por outro lado, em pequenas concentrações de ácido hipocloroso, como 0,25 mg/l, o tempo de início de morte e o valor D se elevam muito, atingindo 134,95 e 46,30 minutos, respectivamente.

Os dados do Quadro 25 foram analisados estatisticamente e constatou-se uma relação linear simples entre os logaritmos decimais dos tempos de início de morte e, por outro lado, entre os logaritmos decimais dos valores D e os logaritmos decimais da concentração de ácido hipocloroso. Para se chegar a essa informação, fundamentamo-nos no trabalho de ODLAUG & PFLUG (1976) que, analisando os dados disponíveis na literatura, encontraram também uma relação linear simples entre o logaritmo decimal para reduzir em 90% o número de esporos de Bacillus e Clostridium e o logaritmo decimal da concentração de ácido hipocloroso. Apesar de não estar bem claro no trabalho desses autores "o tempo para reduzir em 90% o número de esporos", que foi calculado de vários outros trabalhos, parece incluir a fase lag.

Assim, determinamos a equação (2) de regressão linear $Y = -1,0945X + 1,5106$ ($P < 0,05$), onde Y é o logaritmo decimal do tempo de início de morte, em minutos, dos esporos de B. subtilis e X é o logaritmo decimal da concentração de ácido hipocloroso em mg/l (Figura 12). O coeficiente de determinação é 0,99, ou seja, 99% da variação do tempo de início de morte é explicada pela variação na concentração de ácido hipocloroso.

De forma análoga, a equação (3) de regressão linear $Y = -0,8869X + 1,1401$ ($P < 0,05$) relaciona o valor D e a concentração de ácido hipocloroso. Nessa regressão Y é o logaritmo decimal do valor D , em minutos, dos esporos de B. subtilis e X é o logaritmo decimal da concentração de ácido hipocloroso em mg/l (Figura 13). A regressão apresentou um coeficiente de determinação de 0,99, o que significa que 99% da variação no valor D está associada a variação na concentração de ácido hipocloroso.

Finalmente, as equações 1, 2 e 3 podem ser rearranjadas. A nova equação, mostrada a seguir, permite a estimativa do tempo de contato necessário para se obter determinadas reduções decimais do número de esporos de B. subtilis através da ação de soluções cloradas, cujas concentrações em cloro disponível livre e o pH sejam conhecidos.

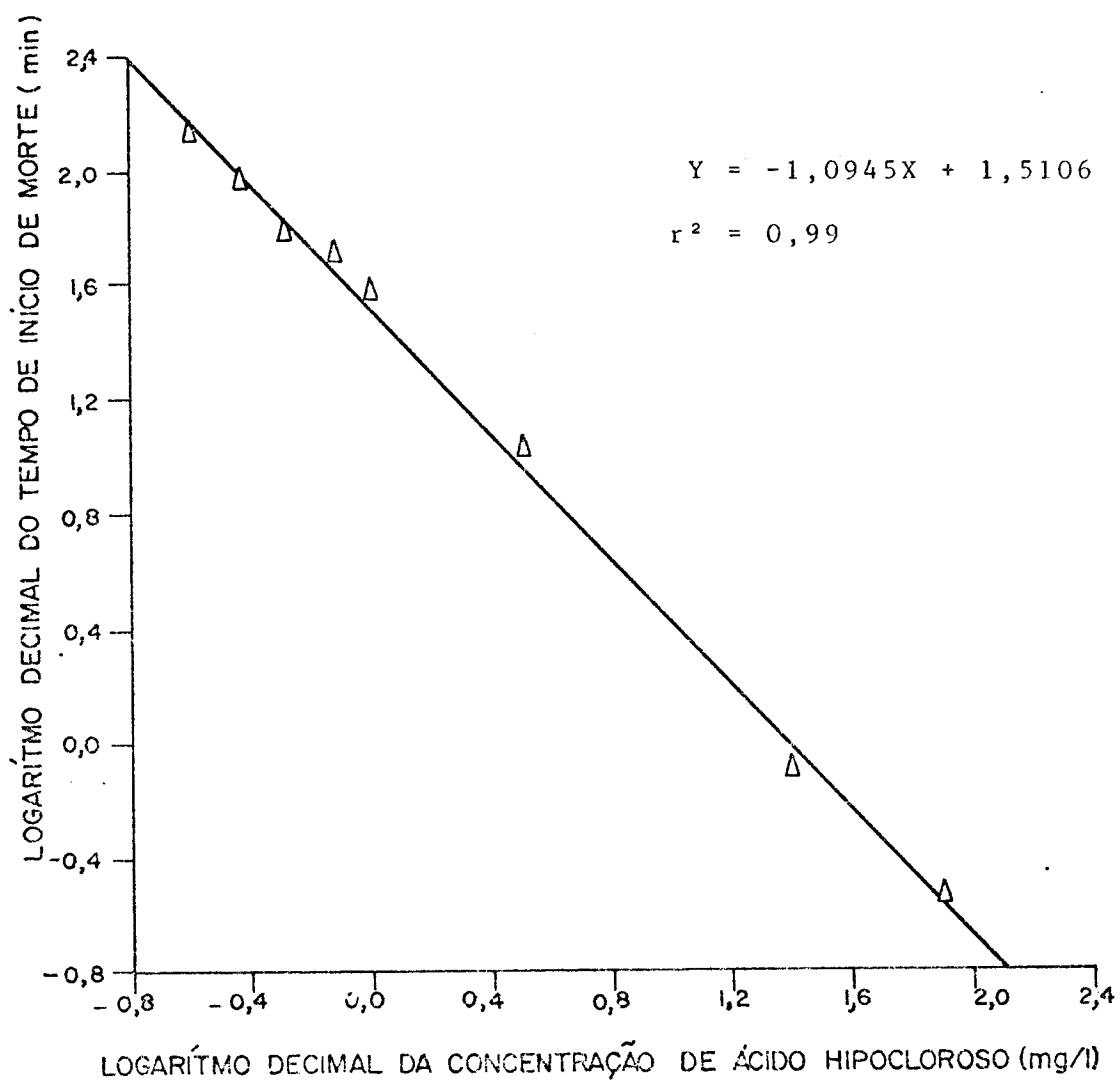
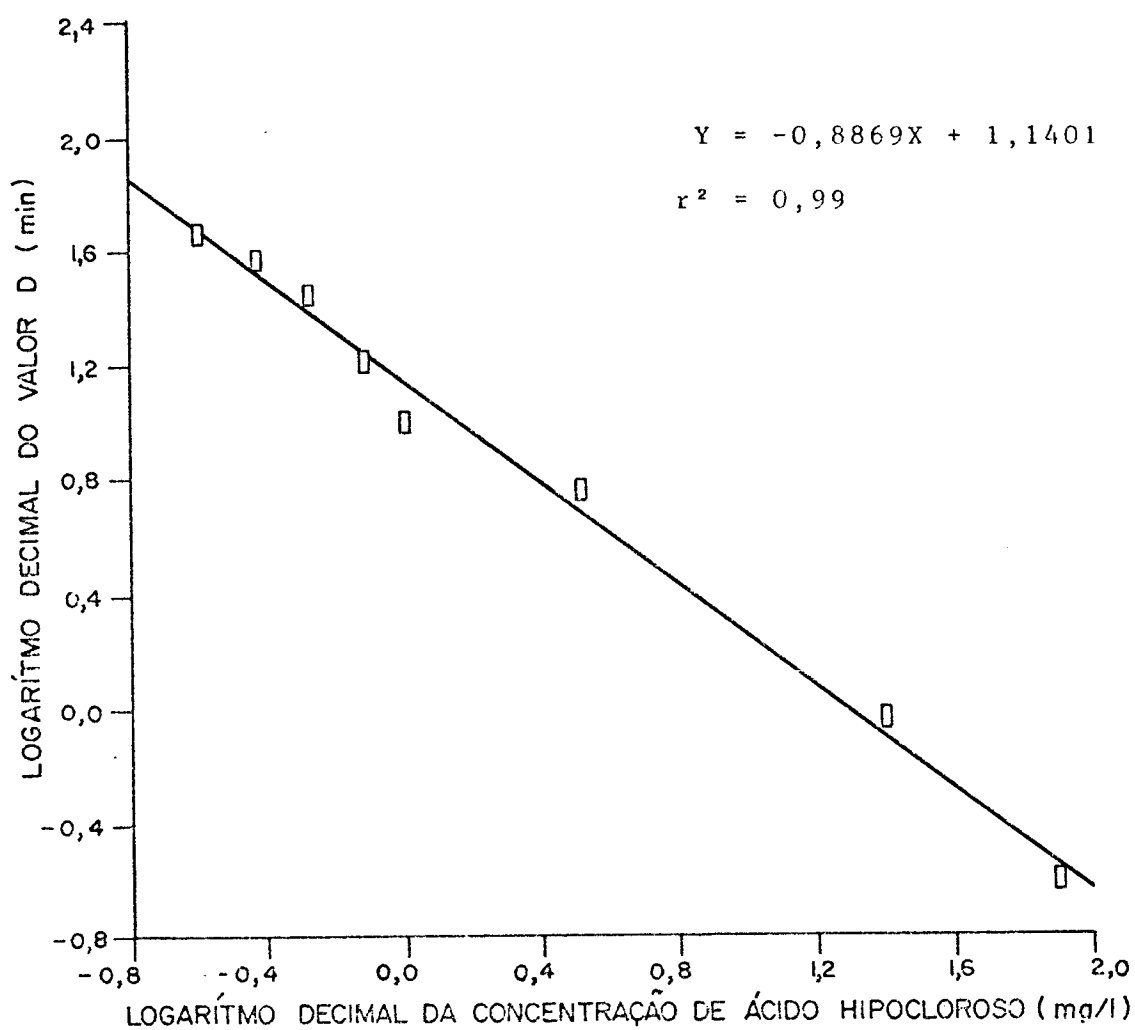


FIGURA 12 - Regressão linear do logaritmo decimal do tempo de início de morte dos esporos de *B. subtilis* em função do logaritmo decimal da concentração de ácido hipocloroso.



URA 13 - Regressão linear do logaritmo decimal do valor D dos esporos de B. subtilis em função do logaritmo decimal da concentração de ácido hipocloroso.

$$T = \text{antilog} [-1,0945 \log \left(\frac{\text{mg/l de cloro disponível livre}}{1 + 10^{\text{pH} - 7,50}} \right) + 1,51061]$$

+

$$a \{ \text{antilog} [-0,8869 \log \left(\frac{\text{mg/l de cloro disponível livre}}{1 + 10^{\text{pH} - 7,50}} \right) + 1,14011] \}$$

(equação 4)

Na equação 4, T é o tempo de contato em minutos do sanificante com os esporos; o valor "a" representa as reduções decimais que se deseja no número de esporos; mg/l de cloro disponível livre e pH referem-se às soluções cloradas em uso. Dando-se o valor zero para a letra "a" na equação 4, é possível obter-se o tempo de início de morte para as condições avaliadas. Por outro lado, tomando-se apenas o segundo termo dessa equação, obtém-se o valor D.

Os tempos de contato obtidos da equação 4 são estimativas válidas quando a ação esporicida é, fundamentalmente, dependente da concentração em cloro disponível livre e do pH das soluções, como ocorreu nas condições experimentais aqui avaliadas. No entanto, mesmo em situações industriais onde outros fatores podem afetar a ação esporicida dos compostos clorados, não há dúvida de que os valores estimados pela equação 4 orientam na tomada de decisão quanto ao tempo de contato para ser usado no procedimento de sanificação para que se elimine esporos, além das formas vegetativas.

5. CONCLUSÕES

Considerando-se as condições experimentais em que trabalhamos, pode-se chegar a várias conclusões.

- 5.1. Lotes de esporos de B. subtilis ATCC 19659, produzidos em tempos diferentes, podem ter a mesma resistência à ação do hipoclorito de sódio.
- 5.2. Até 180 dias, o número dos esporos de B. subtilis ATCC 19659 refrigerados a 4°C em glicerol e água (15 : 85) manteve-se constante; o número dos esporos congelados a -18°C também em glicerol e água (15 : 85) apresentou tendência a aumentar e o número dos esporos liofilizados em tampão fosfato H/15 de pH 7,0 apresentou variações.
- 5.3. A resistência dos esporos de B. subtilis ATCC 19659 ao hipoclorito de sódio manteve-se a mesma durante 150, 120 e 90 dias, quer sob refrigeração a 4°C, quer sob congelamento a -18°C, quer sob liofilização.
- 5.4. A refrigeração a 4°C em glicerol e água (15 : 85) foi a melhor forma de armazenamento dos esporos de B. subtilis ATCC 19659.

- 5.5. A ação do hipoclorito de sódio sobre os esporos de B. subtilis ATCC 19659 em diferentes concentrações e valores de pH pôde ser representada pelas equações de regressão linear do tipo $Y = aX + b$, onde Y representa reduções decimais do número dos esporos e X os tempos de contato do esporo com o sanificante. A partir das equações podem determinar-se dois parâmetros importantes: o tempo de início de morte e o valor D dos esporos.
- 5.6. Há nítida diferença tanto nos tempos de início de morte, quanto nos valores D. Assim, qualquer um desses parâmetros pode ser usado para se avaliar a resistência dos esporos de B. subtilis ATCC 19659 quando se usam diferentes concentrações e valores de pH das soluções de hipoclorito de sódio.
- 5.7. A equação de regressão linear $Y = -1,0945X + 1,5106$ (r^2 de 0,99) exprime o logaritmo decimal do tempo de início de morte (Y), em minutos, dos esporos de B. subtilis ATCC 19659, sendo X o logaritmo decimal da concentração de ácido hipocloroso em mg/l.
- 5.8. A equação de regressão linear $Y = -0,8869X + 1,1401$ (r^2 de 0,99) exprime o logaritmo decimal do valor D (Y), em minutos, dos esporos de B. subtilis ATCC 19659, sendo X o logaritmo decimal da concentração de ácido hipocloroso em mg/l.

5.9. A equação

$$T = \text{antilog} [-1,0945 \log \left(\frac{\text{mg/l cloro disponível livre}}{1 + 10^{\text{pH} - 7,50}} \right) + 1,5106]$$

+

$$a \left(\text{antilog} [-0,8869 \log \left(\frac{\text{mg/l cloro disponível livre}}{1 + 10^{\text{pH} - 7,50}} \right) + 1,1401] \right)$$

exprime o tempo de contato (T), em minutos, do hipoclorito de sódio com os esporos de *E. subtilis* ATCC 19659 necessário para uma determinada redução decimal (a) do número desses esporos, conhecendo-se a concentração em cloro disponível livre e os valores de pH das soluções.

5.10. A eficiência das soluções de hipoclorito de sódio usadas como sanificantes na indústria de alimentos pode ser avaliada pelos esporos de *E. subtilis* ATCC 19659.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABABOUC, L.; DIKRA, A. & BUSTA, F.F. - Tailing survivor curves of Clostridial spores heated in edible oils. J. Appl. Bacteriol., 62 (6): 503-511, 1987.
- ABSHIRE, R.I.; BEVERLY, B. & WILLIAMS, T. - Resistance and recovery studies on ultraviolet-irradiated spores of Bacillus pumilis. Appl. Environ. Microbiol., 39 (4): 695-701, 1980.
- ANAGNOSTOPOULOS, G.D. & SIDHU, H.S. - The effect of water activity on the aw controlling solute on spore germination of Bacillus stearothermophilus. J. Appl. Bacteriol., 50 (2): 335-349, 1981.
- BALDOCK, J.D. - Microbiological monitoring of the food plant methods to asses bacterial contamination on surfaces. J. Milk Food Technol., 37 (7): 361-368, 1974.
- BANWART, G.J. - Basic food microbiology. New York, Van Nostrand Reinhold Company, 1981, 519 p.
- BASS, G.K. - Methods of testing disinfectants. In: BLOCK, S.S. ed. Disinfection, sterilization and preservation, 2a. ed. Philadelphia, Lea e Febiger, 1977, cap. 3, p. 49-77.
- BAYLLIS, C.E. & WAITES, W.M. - The effect of hydrogen peroxide on spores of Clostridium bifermentans. Gen. Microbiol., 96: 401-407, 1976.

- BAYLLIS, C.E.; WAITES, W.H. & KING, M.R. - Resistance and structure of spores of Bacillus subtilis. J. Appl. Bacteriol., 50 (2): 379-390, 1981.
- BERNARDE, M.A.; SNOW, W.B. & OLIVIERI, V.P. - Chlorine dioxide disinfection temperature effects. J. Appl. Bacteriol., 30 (1): 159-167, 1967.
- BLOCHER, J.C. & BUSTA, F.F. - Bacterial spore resistance to acid. Food Technol., 37 (11): 87-99, 1983.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. - Normas higiênicas sanitárias e tecnológicas para a produção e beneficiamento de leite tipo A. Portaria no. 17 da Secretaria de Inspeção de Produto Animal em 29 de outubro de 1984.
- CERF, O. - Tailing of survival curves of bacterial spores, a review. J. Appl. Bacteriol., 42 (1): 1-19, 1977.
- CERF, O. & METRO, F. - Tailing of survival curves of Bacillus licheniformis spores treated with hydrogen peroxide. J. Appl. Bacteriol., 42 (3): 405-415, 1977.
- CERF, O. & MEHIER, J. - Diversité de la resistance des spores de Bacillus à l'eau oxigenée. Le Lait, 52 (511-512): 1-21, 1972.
- CHAMBERS, C.W. - A procedure for evaluating the efficiency of bactericidal agents. J. Milk Food Technol., 19 (7): 183-187, 1956.

- CHUNG, K.; STEPHEN, R.L.; WILSON, P.W. & NELSON, E.P. - Sporidicidal activity of hydrogen peroxide and iodophor on the spores of Clostridium sporogenes. J. Food Sci., 44 (4): 1261-1262, 1979.
- COLE, E.C.; RUTALLA, W.A. & SAMSA, G.D. - Standardization of bacterial numbers on penicylinders used in disinfectant testing: interlaboratory study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70 (4): 635-637, 1987a.
- COLE, E.C.; RUTALLA, W.A. & CARSON, J.L. - Evaluation of penicylinders used in disinfectant testing: bacterial attachment and surface texture. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70 (5): 903-907, 1987b.
- COOK, F.K. & PIERSON, D.M. - Inhibition of bacterial spores by antimicrobials. Food Technol., 37 (11): 127-134, 1983.
- COSTILLO, R.N.; VEBERSAX, M.A. & WARD, P.J. - Use of chlorine dioxide for controlling microorganisms during the handling and storage of fresh cucumbers. J. Food Sci., 49 (2): 396-401, 1984.
- COUSINS, C.H. & ALLAN, C.D. - Sporicidal properties of some halogens. J. Appl. Bacteriol., 30 (1): 168-174, 1967.
- DADD, A.H. & RUMBELOW, J.E. - Germination of spores of Bacillus subtilis var. niger following exposure to gaseous ethylene oxide. J. Appl. Bacteriol., 60 (5): 425-433, 1986.

- DADD, A.H.; TOWN, H.M. & McCORMIC, K.E. - The influence of water on the resistance of spores to inactivation by gaseous ethylene oxide. J. Appl. Bacteriol., 58 (6): 613-621, 1985.
- DOORES, S. - Bacterial spore resistance - species of emerging importance. Food Technol., 37 (11): 127-134, 1983.
- DYCHDALA, G.R. - Chlorine and chlorine compounds. In: BLOCK, S.S. ed. Disinfection, sterilization and preservation, 2 ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1977, cap. 10, p. 167-195.
- DYE, H. & MEAD, G.C. - The effect of chlorine on the viability of clostridial spores. J. Food Technol., 7 (2): 173-181, 1972.
- ELDER, E.D.; WORLEY, S.D. & WILLIAMS, D.E. - Bactericidal properties of an organic N-chloramine formed in situ. J. Appl. Bacteriol., 62 (5): 457-464, 1987.
- ENGLER, R. - Disinfectants. In: MORWITZ, W. ed. Official methods of analysis of the association of official analytical chemists. 14 ed., Washington, D.C. AOAC, 1984.
- ENSWILER-ROSE, B. & KOTULA, A.W. - Inhibition of bacterial growth by two chlorine sources in a model system. J. Food Sci., 49 (3): 931-933, 1984.
- ESKENAZI, S.; BYCHKOWSKY, O.E.; SMITH, H. & MAC MILLAN, J.D. - Evaluation of glutaraldehyde and hydrogen peroxide for sanitizing packaging materials of medical devices in sterility testing. J. Assoc. Anal. Chem., 65 (5): 1155-1161, 1982.

- FAVERO, M.S.; GABIS, D.A. & VESLEY, D. - Environmental monitoring procedures. In: SPECK, M.L. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. American Public Health Association (APHA), Washington, D.C., 2 ed, 1984, Cap. 3, p. 47-60.
- FOEGEDING, P.M. - Bacterial spore resistance to chlorine compounds. Food Technol., 37 (11): 101-104, 1983.
- FOEGEDING, P.M. & BUSTA, F.F. - Proposed mechanism for sensitization by hypochlorite treatment of Clostridium botulinum spores. Appl. Environ. Microbiol., 45 (4): 1374-1379, 1983a.
- FOEGEDING, P.M. & BUSTA, F.F. - Differing L-alanine germination requirements of hypochlorite-treated Clostridium botulinum spores from two crops. Appl. Environ. Microbiol., 45 (4): 1415-1417, 1983b.
- FOEGEDING, P.M.; HENSTAPAT, V. & GIESBRECHT, F.G. - Chlorine dioxide inactivation of Bacillus and Clostridium spores. J. Food Sci., 51 (1): 197-201, 1986.
- FREDELL, D.L.; CORDS, B.B. & GIVINS, B.J. - Effect of pH and water hardness on the sanitizing activity of five comercials iodophors. J. Food Protect., 48 (7): 558-561, 1985.
- GELINAS, P. & GOULET, J. - Heat and light stability of eight sanitizers. J. Food Protect., 45 (13): 1195-1196, 1982.

- GELINAS, P. & GOULET, J. - Neutralization of the activity of eight disinfectants by organic mater. J. Appl. Bacteriol., 54 (2): 243-247, 1983a.
- GELINAS, P. & GOULET, J. - Efficacité de huit désinfectants sur trois types de surfaces contaminées par Pseudomonas aeruginosa. Can. J. Microbiol., 29 (12): 1715-1730, 1983b.
- GELINAS, P.; GOULET, J.; TASTAYRE, G.H. & PICARD, G.A. - Effect of temperature and contact time on the activity of eight disinfectants - A classification. J. Food Protec., 47 (11): 841-847, 1984.
- GOMEAS, D.E. - Bacterial spore resistance to heat. Food Technol., 37 (11): 105-110, 1983.
- GONTIJO FILHO, P.P. & ROMAO, C.H.C.P.A. - Testes microbiológicos e o registro de sanificantes, desinfetantes e antissépticos junto a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Rev. Microbiol., São Paulo, 17 (2): 143-147, 1986.
- GONTIJO FILHO, P.P. - Análise crítica da Portaria no. 67 (1985) do Ministério da Saúde que estabelece normas para o registro de saneantes domissanitários, com ação antimicrobiana, no tocante de uso hospitalar: proposta alternativa. Rev. Microbiol., São Paulo, 19 (2): 155-158, 1988.
- GORHAN, S.P.; SCOTT, E.H.; HUTCHINSON, E.P. & Mc DERMONT, L.H. - Death, injury and revival of chemically treated Bacillus subtilis spores. J. Appl. Bacteriol., 54 (1): 91-99, 1983.

- GORMAN, S.P.; SCOTT, E.M. & HUTCHINSON, E.P. - Emergence and development of resistance to antimicrobial chemicals and heat in spores of Bacillus subtilis. J. Appl. Bacteriol., 57 (1): 153-163, 1984a.
- GORMAN, S.P.; SCOTT, E.M. & HUTCHINSON, E.P. - Hypochlorite effects on spores and spore forms of Bacillus subtilis and on spore lytic enzyme. J. Appl. Bacteriol., 56 (2): 295-303, 1984b.
- GORMAN, S.P.; SCOTT, E.M. & HUTCHINSON, E.P. - Effects of aqueous an alcoholic povidone-iodine on spores of B. subtilis. J. Appl. Bacteriol., 59 (1): 99-105, 1985a.
- GRAVES, R.R.; LESNIEWSKI, R.S. & LAKE, D.E. - Bacteriological quality of cannery cooling water. J. Food Sci., 42 (5): 1280-1284, 1977.
- GOULD, G.W. - Recent advances in the understanding of resistance and dormancy in bacterial spores. J. Appl. Bacteriol., 42 (3): 297-309, 1977.
- HARAKEH, S.; ILLESKAS, A. & MATIN, A. - Inactivation of bacteria by Purogene. J. Appl. Bacteriol., 64: 459-463, 1988.
- HARNULV, B.G.; JOHANSSON, H. & SNYGG, B.G. - Heat resistance of Bacillus stearothermophilus spores at different waters activities. J. Food Sci., 42 (1): 91-93, 1977.

- HAYAKAWA, K. - Empirical formulae for estimating nonlinear survivor curves of thermally vulnerable factors. Can. Inst. Food Sci. Technol. J., 15 (2): 116-119, 1982.
- HONEY, E.V.; SOPER, C.J. & DAVIES, D.J.C. - Biological indicators for low temperature steam formaldehyde sterilization: effect of defined media on sporulation, germination index and moist heat resistance at 110°C of Bacillus strains. J. Appl. Bacteriol., 58 (2): 207-214, 1985.
- INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS (ICMSF). Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration. V. 1, 2 ed., ICMSF, University of Toronto Press, Canada. 1978. 433 p.
- INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE (INCQS) - Técnicas para controle de qualidade: avaliação da atividade antimicrobiana de saneantes domissanitários. Rio de Janeiro, Fundação Osvaldo Cruz, 1985 (Manual Técnico no. 04/85).
- ISHIZACKI, K.; SHINRIKI, N. & MATSUYAMA, H. - Inactivation of Bacillus spores by gaseous ozone. J. Appl. Bacteriol., 60 (1): 67-72, 1986.
- ITO, K.A. - Thermophilic organisms in food spoilage: flat-sours aerobes. J. Food Protec., 44 (2): 157-163, 1981.
- ITO, K.A. & SEEGER, H.L. - Effects of germicides on microorganisms in can cooling waters. J. Food Protec., 43 (6): 484-487, 1980.

- ITO, K.A.; DENNY, C.B.; BROW, C.K.; YAO, M. & SEEGER, M.L. -
Resistance of bacterial spores to hydrogen peroxide. Food Technol., 27 (11): 58-66, 1973.
- JOHNSON, H.G.; TITUS, T.C.; McCASKILL, L.H. & ACTON, J.C. -
Bacterial counts on surfaces of carcasses and in ground beef from carcasses sprayed on not sprayed with hypochlorous acid. J. Food Sci., 44 (1): 169-173, 1977.
- JONES Jr., L.A.; HOFFMAN, R.K. & PHILLIPS, C.R. - Sporocidal activity of sodium hypochlorite at subzero temperatures. Appl. Microbiol., 16 (5): 787-791, 1968.
- KEYNAN, A.; EVENCHICK, Z.; HALVORSON, H.O. & HASTINGS, J.W. -
Activation of bacterial endospores. J. Bacteriol., 88 (2): 313-318, 1964.
- KRAFT, A.A.; REDDY, K.V.; HASIAK, R.J.; LIND, K.D. & GALLOWAY, D.E. - Microbiological quality vacuum packaged poultry or whitout chlorine treatment. J. Food Sci., 47 (2): 380-385, 1982.
- KULIKOWSKI, A.; PANKRATZ, H.S. & SADOFF, H.L. - Ultrastructural chemical changes in spores of Bacillus cereus after action of disinfectants. J. Appl. Bacteriol., 38 (1): 39-46, 1975.
- LaBREE, T.R.; FIELDS, M.L. & DESROSIER, N.W. - Effect of chlorine on spores of Bacillus coagulans. Food Technol., 14 (12): 632-634, 1960.

- LAKE, D.E.; LESNIEWSKY, R.S.; ANDERSON, J.E.; GRAVES, R.R. & BREMSER, J.E. - Enumeration and isolation of mesophilic anaerobic spore-forms from cannery post-processing equipment. J. Food Protect., 48 (9): 794-798, 1985.
- LEAPER, S. - Synergistic killing of spores of Bacillus subtilis by peracetic acid and alcohol. J. Food Technol., 19 (3): 335-360, 1984a.
- LEAPER, S. - Comparision of the resistance to hydrogen peroxide of wet and dry spores of Bacillus subtilis SA 22. J. Food Technol., 19 (6): 695-702, 1984b.
- LEAPER, S. & BLOOK, K. - A note on the effect storage on the chemical resistance of spores of Bacillus subtilis SA 22 and Bacillus subtilis globigii B 17. J. Appl. Bacteriol., 64: 183-186, 1988.
- LEE, C.; MONTVILLE, T.J. & SINSKEY, A.J. - Comparision of the efficacy of steam sterilization indicators. Appl. Environ. Microbiol., 37 (6): 113-117, 1979.
- LEITAO, M.F.F. - Controle de sanificação da indústria de alimentos. ITAL, Campinas. 1976, 71 p. (Instruções Técnicas no. 11).
- LEITAO, M.F.F. - Avaliação da atividade germicida e desempenho de desinfetantes usados na indústria de alimentos. Bol. SBCTA, Campinas, 18 (1): 1-16, 1984.

- LEITAO, M.F.F. - Microbiologia e controle higiênico-sanitário na produção de massas alimentícias. Bol. ITAL, Campinas, 23 (3): 293-310, 1986.
- LEITAO, M.F.F.; MONTEIRO FILHO, E.; DELAZARI, I. & ANGELUCCI, E. - Eficiência de desinfetantes na redução da contaminação bacteriana da alface (Lactuca sativa L.). Bol. ITAL, Campinas, 18 (2): 201-206, 1981.
- LEVINE, K. - Spores as reagents for studies on chemical disinfection. Bacteriological Reviews, 16: 117-124, 1952.
- LEWIS, K.H. - Limpeza, desinfección e higiene. In: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Ecología microbiana de los alimentos. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Editorial Acribia, V. 1, 1980, Cap. 14. p. 242-272.
- LILARD, H.S. - Control of pH in generation chlorine dioxide for bacteriological use in poultry processing water. J. Food Sci., 45 (1): 154, 1980.
- LOPES, J.A. - Evaluation of dairy and food plant sanitizers against Salmonella typhimurium and Listeria monocytogenes. J. Dairy Sci., 69 (11): 2791-2796, 1986.
- MARSHALL, B.J; MURREL, W.G. & SCOTT, W.J. - The effect of water activity, solutes and temperature on the viability and heat resistance of freeze-dried bacterial spores. J. Gen. Microbiol., 31: 451-460, 1963.

- MERCER, W. & SOMMERS, I.I. - Chlorine in food plant sanitation.
In: Advances in food chemistry, V. 7, Academic Press Inc.,
New York, 1957, p. 127-167.
- HOLIN, G. & OSTLUND, K. - Dry heat inactivation of Bacillus subtilis spores by means of infra-red heating. Antonie Van Leeuwenhoek, 41 (3): 329-335, 1975.
- MORRIS, J.C. - The acid ionization constant of HOCl from 5 to 30°C. J. Phy. Chem., 70 (12): 3798-3805, 1966.
- NATIONAL CANNERS ASSOCIATION. Laboratory manual for food canners and processors. V. 1, Westport, Connecticut, AVI Publishing Company. 1968. 336 p.
- NISKANEN, A. & POHJA, M.S. - Comparative studies on the sampling and investigation of microbial contamination of surfaces by the contact plate and swab methods. J. Appl. Bacteriol., 42 (1): 53-63, 1977.
- NOSS, C.I. & OLIVIERI, V.P. - Disinfecting capabilities of oxychlorine compounds. Appl. Environ. Microbiol., 50 (4): 1162-1164, 1985.
- ODLAUG, T.E. - Antimicrobial activity of halogens. J. Food Protec., 44 (8): 608-613, 1981.
- ODLAUG, T.E. & PFLUG, I.J. - Sporocidal properties of chlorine compounds: applicability to cooling water for canned foods. J. Milk Food Technol., 39 (7): 493-498, 1976.

- ODLAUG, T.E. & PFLUG, I.J. - Microbiological and sanitizer analysis of water used for cooling containers of food in commercial canning factories in Minnesota and Wisconsin. J. Food Sci., 43 (3): 954-962, 1978.
- ODLAUG, T.E.; CAPUTO, R.A. & GRAHAM, G.S. - Heat resistance and population stability of lyophilized Bacillus subtilis spores. Appl. Environ. Microbiol., 41 (6): 1374-1377, 1981.
- OLIVEIRA, J.V. - Resistência de Salmonella typhi e Clostridium perfringens ao uso contínuo de hipoclorito de sódio e de um composto de amônio quaternário. Unicamp, Campinas, 1985, 84 p. (Tese de Mestrado).
- PEELER, J.T.; REYES, A.L.; CRAWFOR, R.J.; WENBY, A.J. & CAMPBELL, J.E. - Thermal resistance of Bacillus subtilis var. niger in a closed system. Appl. Environ. Microbiol., 33 (1): 52-58, 1977.
- PFLUG, I.J.; SMITH, G.; HOLCOMB, R. & BLANCHETT, R. - Measuring sterilizing values in containers of food using thermocouples and biological indicators units. J. Food Protec., 43 (2): 119-123, 1980.
- PULEO, J.R.; BERGSTROM, S.L.; PEELER, J.T. & OXBORROW, G.S. - Thermal resistance of naturally occurring airborne bacterial spores. Appl. Environ. Microbiol., 36 (3): 473-479, 1978.
- PUT, H.M.C.; DOREN, H.V.; WARNER, W.R. & KRUISWIJK, J.T.H. - The mechanism of microbiological leaker spoilage of canned foods: a review. J. Appl. Bacteriol., 35 (1): 7-27, 1972.

- PYLE, M.L. & KOBURGER, J.A. - Increased sensitization of shrimp microflora to hypochlorite following a sodium bisulfite dips. J. Food Protec., 47 (5): 375-377, 1984.
- REICH, R.R. - Storage stability of Bacillus subtilis ethylene oxide biological indicators. Appl. Environ. Microbiol., 39 (1): 277-279, 1980.
- RICHARD, J. & PITON, C. - Semilog model for interpreting the results of swabbing surfaces naturally contaminated. J. Appl. Bacteriol., 60 (3): 243-249, 1986.
- RICHARDSON, G.H. ed. - Standard methods for the examination of dairy products. American Public Health Association (APHA), Washington, D.C., 15 ed. 1985, 412 p.
- RIDGWAY, H.F.; OLSON, B.H. - Chlorine resistance patterns of bacteria from two drinking water distribution systems. Appl. Environ. Microbiol., 44 (4): 972-987, 1982.
- ROUNDY, Z.D. - Treatment of milk for cheese with hydrogen peroxide. J. Dairy Sci., 41 : 1460-1465, 1958.
- RUSSEL, A.D. - The destruction of bacterial spores. In: HUGO, W.B. ed. Inhibition and destruction of the microbial cell. London, Academic Press, 1971, cap. 11, p. 451-612.
- SCHWACH, T.S. & ZOTTOLA, A.E. - Scanning electron microscopic study on some effects of sodium hypochlorite on attachment of bacteria to stainless steel. J. Food Protec., 47 (10): 756-759, 1984.

- SCHEUSNER, D.L. - Methods to evaluate cleaners and sanitizers. J. Food Protec., 45 (13): 1257-1260, 1982.
- SERRANO, A.M. - Métodos de amostragem para avaliação de limpeza e sanificação. Revista do ILCT, Juiz de Fora, 39 (235): 13-15, 1984.
- SHAFFER Jr., C.H. - Methods of testing sanitizers and bacteriostatic substances. In: BLOCH, S.S. ed. Disinfection, sterilization and preservation, 2 ed. Philadelphia, Lea e Febiger, 1977, Cap. 4, p. 78-99.
- SMITH, Q.J. & BROW, K.L. - The resistance of dry spores of Bacillus subtilis var. globigii (NCIB 8058) to solutions of hydrogen peroxide in relation to aseptic packaging. J. Food Technol., 15 (2): 169-179, 1980.
- SNEATH, P.H.A. - Endospore-forming gram-positive rods and cocci. In: SNEATH, P.H.A.; HAIR, N.S.; SHARPE, H.E. & HOLT, J.G., ed. Bergey's manual systematic bacteriology, 9 ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1986. V. 2, p. 1104-1206.
- SONNERS, I.I. - Studies on in-plant chlorination. Food Technol., 5 (2): 46-51, 1951.
- STALKER, R.H. & THORPE, R.H. - The chlorine resistance of clostridia and their occurrence in cannery cooling water; a review of published data. The Campden Food Preservation Research Association, Gloucestershire, England, 1984. 6 p. (Technical Note, no. 164).

- STEVENSON, K.E.; SHAFER, B.D. - Bacterial spore resistance to hydrogen peroxide. Food Technol., 37 (11): 111-114, 1983.
- STONE, L.S. & ZOTTOLA, E.A. - Effect of cleaning and sanitizing on the attachment of Pseudomonas fragi to stainless steel. J. Food Sci., 50 (4): 951-956, 1985.
- TAMPLIN, T.C. - CIP Technology, detergents and sanitizers. In: JOWIT, R. ed. Hygienic design and operation of food plant. Westport, Connecticut, AVI Publishing Company, 1980, Cap. 11, p. 183-224.
- TIMENETSKY, J. & ALBERTUM, F. - Determinação da atividade microbiana de desinfetantes domésticos. Rev. Microbiol., 19 (1): 46-51, 1988.
- TROUT, J.R. - Statistical examination of AOAC use-dilution method for testing disinfectant efficacy. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68 (4): 763-765, 1982.
- TRUEMAN, J.R. - The halogens. In: HUGO, W.B. ed. Inhibition and destruction of the microbial cell. London, Academic Press, 1971, cap. 3E, p. 137-181.
- WALLEN, S.E. & WALKER, H.W. - Influence of media and media constituents on recovery of bacterial spores exposed to hydrogen peroxide. J. Food Sci., 44 (2): 560-563, 1979.

- WALLEN, S.E. & WALKER, H.W. - Resistance of spores of Bacillus subtilis var. niger produced from subcultures of spores surviving hydrogen peroxide exposure. J. Food Protec., 43 (7): 528-529, 1980.
- WARD, N.R.; WOLFE, R.L. & OLSON, B.H. - Effect of pH, application technique and chlorine-to-nitrogen ratio on disinfectant activity of inorganic chloramines with pure culture bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 48 (3): 508-514, 1984.
- WANG, H.Y.; COLLINS, E.B. & LOBEEN, J.C. - Destruction of psychrophilic strains of Bacillus by chlorine. J. Dairy Sci., 56 (10): 1253-1257, 1973.
- WEI, C.; COOK, D.L. & KIRK, J.R. - Use of chlorine compounds in the food industry. Food Technol., 39 (1): 107-115, 1985.
- WILLIAMS, D.E.; WORLEY, S.D.; WEATLEY, W.B. & SWANGO, L.J. - Bactericidal properties of a new water disinfectants. Appl. Environ. Microbiol., 49 (3): 637-643, 1985.
- WYATT, L.R. & WAITES, W.H. - The effect of hypochlorite on the germination of spores of Clostridium bifermentans. J. Gen. Microbiol., 78: 383-385, 1973.
- WYATT, L.R. & WAITES, W.H. - The effect of chlorine on spores of Clostridium bifermentans, Bacillus subtilis and Bacillus cereus. J. Gen. Microbiol., 89: 337-344, 1975.

YILDZ, F. - Some factors affecting the growth, sporulation and thermal resistance of Bacillus stearothermophilus. University of Maryland, 101 p., 1978. (Ph.D. Thesis).

7. APÊNDICE

QUADRO 1A - Reduções decimais e valores D em células vegetativas após serem submetidas ao hipoclorito de sódio (105 mg/l de cloro disponível livre, pH 9,8 e tempo de contato de 30 segundos a 30°C). Média de quatro repetições.

Microrganismo	Reduções	Valores D
	decimais	(seg)
<u>Staphylococcus aureus</u> ATCC 6538	> 6,51	< 4,61
<u>Escherichia coli</u> ATCC 11229	> 6,40	< 4,69
<u>Salmonella tify</u> ATCC 6539	5,12	5,86
<u>Salmonella choleraesius</u> ATCC 10708	> 6,40	< 4,69
<u>Pseudomonas aeruginosa</u> ATCC 15442	> 6,63	< 4,53

QUADRO 2A - Reduções decimais (média de 3 lotes) do número de esporos de *E. subtilis* quando submetidos a formulações de hipocloritos comerciais antes e após serem usadas em equipamentos.

Hipoclorito comercial	Concentração em cloro disponível livre (mg/l)		pH		Tempo de contato no laboratório (min)	Reduções decimais	
	Antes	Após	Antes	Após		Antes	Após
1	93	71	8,65	8,60	10	2,27	1,05
2	71	57	8,50	8,50	15	3,16	1,37
3	160	114	11,45	11,35	145	*	*
4	71	57	10,88	10,62	145	0,25	0,13
5	71	57	9,50	9,25	145	1,14	0,13
6	93	50	8,70	8,60	12	2,68	1,29
7	174	85	9,70	9,35	86	5,28	5,28
8	185	78	9,77	9,10	60	2,47	2,53
9	100	86	8,20	8,60	4	1,53	*
10	100	86	8,20	8,60	4	1,53	*

* Não houve redução.

1 e 2 - Soluções circuladas em equipamentos de ordenha mecânica durante 3 minutos.

3, 4, 5 e 6 - Soluções circuladas no pasteurizador e na empacotadora de leite durante 10 minutos.

7 e 8 - Soluções circuladas em equipamento de ultrafiltração de leite durante 30 minutos.

9 e 10 - Soluções circuladas, respectivamente, no misturador e no cutter de uma indústria de carnes durante 2 minutos.

QUADRO 3A - Tempos de contato experimentais e estimados pela equação* quando esporos de *B. subtilis* foram submetidos a formulações de hipocloritos comerciais em diferentes concentrações e valores de pH.

Hipoclorito comercial	Concentração em cloro disponível livre (mg/l)	pH	Reduções decimais	Tempo de contato (min)	
				experimental	estimado
1	93	8,65	2,27	10	10,71
2	71	8,50	3,16	15	12,48
6	93	8,70	2,68	12	13,10
7	174	9,70	5,28	86	95,99
8	185	9,77	2,47	60	66,51
9 e 10	100	8,20	1,53	4	3,24

$$T \text{ (min)} = \text{antilog} \left[-1,0945 \log \left(\frac{\text{mg/l de cloro disponível livre}}{1 + 10^{\text{pH} - 7,50}} \right) + 1,5106 \right]$$

+

$$a \text{ (antilog} \left[-0,8869 \log \left(\frac{\text{mg/l de cloro disponível livre}}{1 + 10^{\text{pH} - 7,50}} \right) + 1,1401 \right])$$