

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

A DESINFECÇÃO COMO BARREIRA SANITÁRIA NA PREVENÇÃO DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA): SENSIBILIDADE DE AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS EM ALIMENTOS NO IPB-LACEN/RS, NOS ANOS DE 2002 a 2006, FRENTE AO HIPOCLORITO DE SÓDIO.

Jane Mari Corrêa Both

PORTO ALEGRE
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

A DESINFECÇÃO COMO BARREIRA SANITÁRIA NA PREVENÇÃO DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS (DTA): SENSIBILIDADE DE AMOSTRAS DE *Staphylococcus aureus* ISOLADAS EM ALIMENTOS NO IPB-LACEN/RS, NOS ANOS DE 2002 a 2006, FRENTE AO HIPOCLORITO DE SÓDIO.

Jane Mari Corrêa Both

Dissertação de Mestrado apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, na especialidade de Epidemiologia, Saneamento e Profilaxia.

Orientador: Prof. Dr. César A. M. Avancini

PORTO ALEGRE
2007

B749d Both, Jane Mari Corrêa

A desinfecção como barreira sanitária na prevenção de doenças transmitidas por alimentos (DTA): sensibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* (coagulase positiva), isolados em alimentos no IPB-LACEN/RS, nos anos de 2002 a 2006, frente ao hipoclorito de sódio / Jane Mari Corrêa Both - Porto Alegre:UFRGS, 2007.

53 f.; il. – Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2006. César A . M. Avancini, Orient.

1. *Staphylococcus aureus* 2. Hipoclorito de sódio
3. Desinfecção 4. Antimicrobianos: resistência
5. Doenças transmitidas por alimentos (DTA)
I. Avancini, César A . M., Orient. II. Título

CDD 619.46

Catálogo na fonte preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Veterinária da UFRGS

Jane Mari Corrêa Both

Dissertação “A desinfecção como barreira sanitária na prevenção de doenças transmitidas por alimentos (DTA): sensibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas em alimentos no IPB-LACEN/RS, nos anos de 2002 a 2006, frente ao hipoclorito de sódio”, aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre pelo Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aprovada em 10 de janeiro de 2007.

Comissão formada pelos professores:

Prof. Dr. César Augusto Marchionatti Avancini

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Claudiomar Soares Brod

Membro da Comissão

Prof. Dr. Eduardo César Tondo

Membro da Comissão

Prof. Dr. José Maria Wiest

Membro da Comissão

Aos meus filhos Eduardo e Daniel.

AGRADECIMENTOS

À amiga e companheira de trabalho Solange Longaray pelo apoio e colaboração.

Ao Prof. César Avancini, pela confiança e orientação acadêmica.

À Direção do IPB-LACEN/RS e aos colegas da Divisão de Análise de Produtos, em especial aos colegas da Seção de Água e Alimentos, pelo esforço de colocar à minha disposição a estrutura física necessária, além do apoio Técnico e do incentivo oferecidos durante a realização deste trabalho.

RESUMO

As doenças transmitidas por alimentos provocam perdas humanas, sociais e econômicas, sendo que, para a prevenção de suas ocorrências, a higienização (limpeza e desinfecção) do ambiente de processamento e manipulação é procedimento de relevante importância. Para promover a segurança microbiológica dos alimentos, os compostos inorgânicos liberadores de cloro livre estão entre os desinfetantes químicos mais utilizados. No entanto, as evidências indicam que não há agente químico antimicrobiano frente aos quais os microrganismos não apresentem ou não possam ser selecionados por algum grau de resistência. Para obter dados sobre a ação do cloro como barreira sanitária, o objetivo deste trabalho foi o de verificar, frente ao hipoclorito de sódio, a sensibilidade de 32 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas no IPB/LACEN/RS de alimentos envolvidos em surtos de DTA entre os anos 2002 e 2006. Através do teste de suspensão, simularam-se condições de uso: concentração de 200 ppm de cloro livre, na ausência e na presença de matéria orgânica (1% de leite U.H.T. integral); subconcentração de 100 ppm de cloro livre; e quatro tempos de contato (5, 10, 15 e 30 minutos). A 200 ppm, na ausência de matéria orgânica, as 32 amostras foram sensíveis, sendo que, aos 10 minutos, 31 delas já estavam inativadas. A 200 ppm, na presença de matéria orgânica, mesmo aos 30 minutos de contato, 27 foram resistentes. Com 100 ppm de cloro livre, foram necessários 30 minutos de contato para que 24 amostras apresentassem sensibilidade. Concluiu-se que a sensibilidade das amostras foi influenciada pela concentração, pela presença de matéria orgânica e pelo tempo de contato. Considerando as condições do experimento quanto à efetividade do cloro como barreira sanitária em DTA, frente ao *Staphylococcus aureus*, esses três fatores precisam ser levados em consideração.

ABSTRACT

*Foodborne diseases cause human, social and economic losses. Their occurrence can be avoided chiefly by cleaning and disinfection measures in processing and manipulation premises. Inorganic chlorine compounds are among the most common chemical disinfectants used to promote microbiological food safety. However, evidences indicate that microorganisms are capable to present or develop some degree of resistance to practically every known chemical agent. So, in order to obtain data regarding chlorine compounds as a sanitary barrier, this work evaluated the sensitivity, to sodium hypochlorite, of 32 samples of *Staphylococcus aureus* isolated at IPB-LACEN/RS from food involved in foodborne diseases outbreaks occurred between 2002-2006. Through the suspension test, usage conditions were simulated: a 200 ppm free chlorine solution in the absence and presence of organic matter (1% UHT whole milk); a sub-concentration of 100 ppm free chlorine solution; and four contact times (5, 10, 15 and 30 minutes). At the concentration of 200 ppm, in absence of organic matter, all the 32 samples were sensitive. After 10 minutes, 31 of them were already inactivated. At 200 ppm, in presence of organic matter, 27 strains were resistant even after a contact of 30 minutes. At 100 ppm free chlorine concentration, simulating a sub concentration usage, it was necessary a 30 minutes contact to 24 samples demonstrate some sensitivity. It was concluded that the sensitivity of samples was influenced by concentration, presence of organic matter and contact time. In view of the experimental conditions relative to chlorine efficacy as a sanitary barrier, in foodborne diseases associated to *Staphylococcus aureus*, these three factors must be considered.*

LISTA DE TABELAS

	Pag
TABELA 1- Sensibilidade e resistência das 32 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas no IPB-LACEN/RS entre 2002 e 2006, de alimentos envolvidos em surtos de DTA, frente ao hipoclorito de sódio em duas concentrações, com e sem matéria orgânica, usando o teste de suspensão em 30 minutos de contato.....	31
TABELA 2- Sensibilidade e resistência das 32 amostras de <i>Staphylococcus aureus</i> isoladas no IPB-LACEN/RS entre 2002 e 2006, em alimentos isolados em surtos de DTA, frente ao hipoclorito de sódio em duas concentrações, com e sem matéria orgânica, usando o teste de suspensão e considerando o tempo de contato.....	35

SUMÁRIO

	Pág
RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE TABELAS	7
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	12
2.1 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)	12
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.3 Fontes de Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.4 Desinfecção: Controle de Microrganismos no Ambiente	17
2.5 Desinfetantes: Sensibilidade e Resistência	19
2.6 O Cloro como Desinfetante	22
2.7 Avaliação da Eficácia do Desinfetante e da Sensibilidade da Bactéria....	24
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1 Amostras Bacterianas	26
3.2 Reativação das Amostras.....	26
3.3 Provas Bioquímicas.....	27
3.4 Teste de Sensibilidade do <i>Staphylococcus aureus</i> ao Hipoclorito de Sódio	28
3.5 Análise Estatística	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1 Apresentação e Discussão dos Resultados	31
4.2 Apresentação dos Resultados Estatísticos.....	37
5 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS.....	40
APÊNDICES.....	46
ANEXOS	48

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde, no ano de 2000, 2,1 milhões de pessoas no planeta morreram de doenças diarréicas, muitas delas atribuídas a alimentos e água contaminados. Nos EUA, 76 milhões de casos de doenças transmitidas por alimentos são relatados a cada ano, resultando em 325.000 hospitalizações e 5.000 mortes (WHO, 2002). No Brasil, de 1999 a 2005, foram notificados 4.716 surtos de DTA, com 98.018 pessoas acometidas e registro de 39 óbitos segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde (BRASIL, 2006).

No período de 1999 a 2005, o estado do Rio Grande do Sul notificou 1.275 surtos de DTA. Excluindo os casos e surtos sem informação, 59,5% ocorreram em residências. Nestes, 44,4% foram identificados como fonte de contaminação ovos e produtos à base de ovos e 18%, por alimentos de origem mista. *Salmonella* spp foi detectada em 64,2% dos surtos (BRASIL, *op. cit.*). Em levantamento epidemiológico de período anterior, também realizado nesta unidade federativa foi observado que, na série histórica de surtos de DTA investigados de 1987 a 2000, o número de surtos foi de 1.298, e destes, 147 foram causados por *Staphylococcus aureus*, perfazendo 11% do total de surtos no período (RIO GRANDE DO SUL, 2000).

Entre as causas mais freqüentes apontadas como favorecedoras da contaminação dos alimentos são citadas: a falta de qualificação dos manipuladores no que diz respeito às boas práticas de processamento, as precárias condições de manuseio e conservação bem como a deficiente higienização do ambiente onde esses alimentos são preparados (GERMANO & GERMANO, 2001).

A higiene é um elemento básico para a segurança e qualidade dos alimentos. Segundo a ICMSF (1997), ela cria impactos tanto nos alimentos produzidos e consumidos localmente, quanto no comércio alimentar internacional, e as práticas não higiênicas, seja durante a produção, a colheita ou o processamento podem provocar a deterioração do alimento ou mesmo promover a veiculação de doenças.

Com o objetivo de promover a proteção da saúde da população, no que se refere ao controle sanitário na área de alimentos, o Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação – Resolução RDC nº 216 (BRASIL, 2004) estabelece

procedimentos para garantir as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. Entre os procedimentos aplicáveis, o que diz respeito especificamente à higienização, esta é definida como sendo operação que compreende duas etapas: a limpeza e a desinfecção. Enquanto a limpeza refere-se à remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos, a desinfecção refere-se à operação de redução, por método físico ou agente químico, do número de microrganismos no ambiente em nível que não comprometa a qualidade do alimento.

Entre os desinfetantes químicos autorizados para serem usados em superfícies de ambientes onde são manipulados alimentos (BRASIL, 1988), segundo Andrade e Macêdo (1996), o cloro, sob a forma de hipoclorito de sódio, tem sido o composto mais utilizado para garantir a qualidade microbiológica da água e dos alimentos, bem como para aumentar a vida útil de produtos processados. Também esse composto químico é, comparativo com outros desinfetantes, de baixo custo e de fácil acesso, estando amplamente disponível no comércio.

No entanto, conforme alertam algumas pesquisas (MCDONNELL & RUSSEL, 1999; CHAPMANN, 1998) a experiência com resistência a antibióticos e a biocidas indicam que não há agente químico antimicrobiano que não possa, eventualmente, selecionar ou induzir resistência nos microrganismos. Especificamente frente ao cloro, Dychdala (1991) informa que existem evidências de que vários microrganismos apresentam diferentes graus de resistência a esse antimicrobiano.

No IPB-LACEN/RS (Instituto de Pesquisas Biológicas/Laboratório Central de Saúde Pública/SES/RS), entre os anos de 2002 e 2006, foram isoladas 32 amostras de *Staphylococcus aureus* em alimentos envolvidos em surtos de DTA. Tendo como tema a desinfecção como barreira sanitária na prevenção ou controle de toxinfecções alimentares, propôs-se como problema de pesquisa perguntar sobre a sensibilidade dessas amostras isoladas de alimentos frente ao hipoclorito de sódio. Como hipótese, colocou-se a expectativa de que elas apresentassem diferentes graus de sensibilidade (inativação), ou resistência, ao desinfetante, sendo a variação dependente de fatores ambientais ou de manuseio.

Os objetivos gerais deste trabalho foram o de agregar informações sobre a sensibilidade e possíveis resistências de microrganismos ao composto químico desinfetante hipoclorito de sódio, ou por outro ângulo, a eficácia desse antimicrobiano em cenários epidemiológicos concretos. Também geral foi o objetivo de

instrumentalizar agentes de vigilância sanitária com dados atuais sobre a utilização do cloro na prevenção de DTA. Como objetivo específico foi proposto verificar a sensibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas em alimentos no IPB-LACEN/RS, nos anos de 2002 a 2006, frente ao antimicrobiano de ambiente hipoclorito de sódio, simulando condições de uso em duas concentrações, diversos tempos de contato e na presença de matéria orgânica.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA)

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o alimento deve estar disponível às pessoas em quantidade e qualidade nutricionalmente adequadas, além de ser livre de contaminações que possam levar ao desenvolvimento de doenças de origem alimentar. Alimentos contaminados são nocivos à saúde de quem os consomem, provocando diversas enfermidades. Dados demonstram que os agentes etiológicos são, na maioria das vezes, microrganismos, e a contaminação pode ocorrer em diversas fases do processamento do alimento. Dessa forma, são necessárias medidas de controle em todas as etapas do processamento: colheita, conservação, manipulação, transporte, armazenamento, preparo e distribuição dos alimentos (LEMOS, 1999).

Silva Júnior (2002) ao ser servida uma refeição, ela pode estar boa, aparentemente boa ou má. Uma refeição boa fornece ao corpo todos os nutrientes necessários ao desenvolvimento da vida e também está livre de contaminação potencialmente prejudicial. A refeição aparentemente boa é aquela que não apresenta alteração das características sensoriais (aroma, sabor), mas está contaminada. E uma refeição má apresenta suas propriedades organolépticas (sensoriais) alteradas, ou seja, a aparência, o aroma e o sabor mostram que ela está estragada. Para haver uma contaminação basta ocorrer uma falha na escolha de produtos, ou na técnica de conservação, na técnica de preparo ou finalmente nas normas de higiene.

Riedel (1987 *apud* LEMOS, 1999) verificou que, geralmente, as pessoas sofrem de perturbações nutricionais por falta, por excesso ou por seleção inadequada de seus alimentos. Estas perturbações são agravadas quando as condições sanitárias dos alimentos, através da manipulação e conservação, são inadequadas.

As enfermidades de origem alimentar ocorrem quando uma pessoa contrai uma doença devido à ingestão de alimentos contaminados com microrganismos ou toxinas indesejáveis. Essa condição é denominada como toxinfecção alimentar. Muitos casos de enfermidades causadas por alimentos não são notificados, pois seus sintomas são muitas vezes pouco expressivos e inespecíficos. Os sintomas mais comuns de doença

de origem alimentar incluem dor de estômago, náusea, vômito, diarreia e febre (FORSYTHE, 2002).

O Ministério da Saúde, na RDC nº12/2001, define Doença Transmitida por Alimentos (DTA) como uma síndrome originada pela ingestão de alimentos e/ou de água que contenham agentes etiológicos (biológicos, toxinas, físicos ou substâncias químicas) em quantidades tais que afetem a saúde do consumidor em nível individual ou grupo de população (BRASIL, 2001).

Segundo Lemos (1999), as doenças de origem alimentar podem ser divididas em três grupos:

A) Toxinfecções Alimentares - doenças veiculadas pelos microrganismos e parasitas (bactérias, fungos, vírus, protozoários e helmintos) e seus produtos tóxicos.

B) Intoxicações Químicas - doenças advindas da ingestão de alimentos contaminados por metais, agrotóxicos e substâncias raticidas e inseticidas colocadas como proteção contra pragas.

C) Intoxicações Naturais - estas intoxicações são decorrentes da confusão na escolha dos produtos semelhantes, porém com espécies tóxicas de plantas e cogumelos ou contaminação natural de peixes, moluscos, mexilhões com substâncias tóxicas.

Para Leitão (1987 *apud* LEMOS, 1999) as doenças de origem alimentar podem ser divididas em duas categorias: as infecções e as intoxicações. Para este autor as infecções são causadas pela ingestão de células viáveis do microrganismo patogênico, as quais, uma vez no interior do organismo, colonizam órgãos com a conseqüente reação dos mesmos à sua presença, desenvolvimento, multiplicação ou toxinas elaboradas. O autor ressalta ainda que as intoxicações são provocadas pela ingestão de toxinas decorrentes da intensa proliferação do microrganismo patogênico no alimento. São exemplos deste processo as intoxicações causadas por *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e cepas de *Bacillus cereus*.

Atualmente, a transmissão de doenças infecciosas por alimentos constitui um evento freqüente que, em algumas situações, pode apresentar elevada gravidade para um grande número de pessoas no Brasil e no mundo (BRASIL, 2005).

As DTA não representam apenas um dano passageiro, sendo que 2 a 3% dos casos desenvolvem problemas crônicos, causando impactos econômicos. As conseqüências crônicas provocadas pela ingestão de alimentos contaminados por bactérias podem manifestar-se através de diversas doenças como, por exemplo, as doenças reumatóides provocadas por bactérias Gram-negativas ou ainda doenças auto-

imunes ou super-antigênicas provocadas pelos gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Yersinia* e *Clostridium*, relacionadas com distúrbios auto-imunes, inclusive podendo provocar diabete *melittus* insulino-dependente. A *E. coli* O157:H7 provoca a síndrome urêmica hemolítica, levando à falência renal principalmente em crianças. Estas bactérias têm distribuição mundial, então assim como se observa o aumento da incidência de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, pode-se esperar o aumento das seqüelas crônicas (PINTO, 1999).

As toxinfecções alimentares de origem microbiana têm sido reconhecidas como o problema de Saúde Pública mais abrangente no mundo atual e causa importante na diminuição da produtividade, das perdas econômicas que afetam países, empresas ou simplesmente consumidores. O impacto econômico negativo estabelecido por estas enfermidades alcança níveis cada vez mais preocupantes, acarretando grandes perdas econômicas para as indústrias, o turismo e a sociedade (NASCIMENTO, 2000).

Surtos de intoxicação alimentar são frequentemente relatados, sendo comuns os causados por *Staphylococcus aureus*, pois havendo no alimento condições favoráveis à multiplicação, em poucas horas certas linhagens produzem uma toxina termoestável que é responsável pelo quadro clínico (RADDI *et al.*, 1988). A toxina forma-se durante a multiplicação dos microrganismos no alimento antes de ser ingerido, e não após a ingestão. Os sintomas aparecem rapidamente, em geral após 4 a 6 horas. Os sintomas caracterizam-se por vômitos intensos, diarreia, dor abdominal e, às vezes, seguida de colapso. Os *Staphylococcus aureus* são fácil e rapidamente destruídos pelo calor, mediante a pasteurização ou a simples cocção. A toxina é mais resistente ao calor e é destruída durante a ebulição por 30 minutos (LEMOS, 1999).

Também Cunha Neto *et al.* (2002) indicaram que intoxicação alimentar provocada por *Staphylococcus aureus* é devido à ingestão de enterotoxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento, representando um risco para saúde pública. A enterotoxina estafilocócica é termoestável, e está presente no alimento mesmo após o cozimento, possibilitando desta forma a instalação de um quadro de intoxicação de origem alimentar. Os autores informam ainda que esse agente é o responsável por aproximadamente 45% das toxinfecções no mundo e vários trabalhos apontam os manipuladores de alimentos como os maiores responsáveis pela sua transmissão. O período de incubação e a severidade dos sintomas dependem da quantidade de enterotoxina ingerida e da susceptibilidade do indivíduo. Níveis dessas

toxinas variando de 0,01 a 0,4 μ g por grama do alimento são suficientes para provocar a intoxicação, afetando indivíduos mais sensíveis.

2.2 *Staphylococcus aureus*

Os estafilococos são bactérias Gram-positivas, imóveis, de forma esférica, agrupadas em massa irregular em forma similar a de “cacho” de uva. Apresentam metabolismo aeróbio e anaeróbio, atuando sobre carboidratos com produção de ácidos. O *Staphylococcus aureus* é um dos agentes mais comuns, responsável por surtos de intoxicação de origem alimentar (CUNHA NETO *et al.*, 2002).

Segundo Trabulsi *et al.* (1999), os *Staphylococcus* são divididos em duas categorias: coagulase positivas e coagulase negativas, e entre os coagulase positiva o *Staphylococcus aureus* representa a espécie geralmente envolvida em infecções humanas.

Segundo Tortora *et al.* (2000), o *Staphylococcus aureus* é o mais patogênico dos *Staphylococcus* e quase todas as cepas patogênicas de *S. aureus* são coagulase positivas, produzem toxinas estafilocócicas, as enterotoxinas, que afetam o trato gastrointestinal.

Atualmente, órgãos internacionais como Organização Mundial da Saúde, International Committee on Microbiological Specification for Foods (ICMSF) e a American Public Health Association (APHA), recomendam padrões e métodos de análise microbiológica tanto clínica como de alimentos para a rotina laboratorial, testes bioquímicos mínimos para diferenciação na área clínica de *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, e em análise de alimentos o *S. aureus* e *S. epidermidis*. No Brasil, para a identificação de *S. aureus*, são recomendados os testes de produção de coagulase, termonuclease, coloração de Gram e catalase, permitindo diferenciar o *S. aureus* de *S. intermedius* e *S. hyicus*. Alguns autores relacionam testes bioquímicos, como a produção de coagulase, termonuclease, hemólise e fermentação de manitol com a capacidade das cepas de *Staphylococcus* spp. e *S. aureus* em produzirem enterotoxinas. Estes são testes indiretos, úteis para detecção de cepas potencialmente enterotoxigênicas, embora autores tenham verificado que características fisiológicas

podem ou não diferenciar cepas enterotoxigênicas das não enterotoxigênicas (CUNHA NETO *et al.* 2002).

2.3 Fontes de Infecção por *Staphylococcus aureus*

Segundo Silva Júnior (2002), o homem pode contaminar-se diretamente de outra pessoa, ou indiretamente através da água, do solo, ar, fômites e alimentos. Nesta cadeia epidemiológica, o alimento é um carreador de contaminação, que por sua vez pode receber uma contaminação diretamente das vias de eliminação do homem e dos animais. A transmissão pode ser feita pelo próprio homem direta ou indiretamente, se estiver doente ou se for portador são.

Os *Staphylococcus* são amplamente distribuídos na natureza e fazem parte da microbiota normal da pele e mucosas de mamíferos e aves. O principal reservatório, no homem, são as fossas nasais. A ocorrência neste sítio é tamanha, que parece ser impossível sua eliminação. Os fatores que mais predisõem à contaminação do alimento vêm da inadequada manipulação dos produtos, resultando em contaminação cruzada na exposição dos produtos a temperaturas adequadas ao crescimento bacteriano (MESQUITA *et al.* 2006).

Os microrganismos patógenos podem se manter em partículas de alimentos ou de água sobre utensílios lavados inadequadamente. Do ponto de vista sanitário, o uso de recipientes e utensílios contaminados representa um risco, particularmente quando se refere a alimentos cozidos que não se destinam ao consumo imediato (SILVA JÚNIOR, 2002).

De acordo com Raddi *et al.* (1998), os manipuladores de alimentos que são portadores nasais de *S. aureus*, tendo as mãos como veículo de trabalho, podem perpetuar a cadeia epidemiológica de intoxicação alimentar. Estudos epidemiológicos vêm sendo realizados na tentativa de estabelecer uma possível ligação entre portadores de *S. aureus*, a disseminação do mesmo e perpetuação de cepas resistentes, que se propagariam no ambiente familiar e de trabalho.

A detecção e controle de portadores de *Staphylococcus aureus* assumem significativa importância quando se trata de profissionais da área de saúde e

manipuladores de alimentos, devido à existência de cepas produtoras de enterotoxinas (ANDRADE & ZELANTE, 1989).

Um dos objetivos da contagem de *S. aureus* em alimentos está relacionado com o controle da qualidade higiênico-sanitária dos processos de produção de alimentos, condição em que serve como indicador de contaminação pós-processo ou das condições sanitárias das superfícies destinadas ao contato com alimentos (SILVA *et al.*, 1997).

Para Silva Junior (2002), a razão para limpar e “sanificar” (desinfetar) as superfícies que entram em contato com os alimentos e o ambiente, deve-se ao fato dessas operações auxiliarem o controle microbiológico, o que pode influir sobre a estabilidade e inocuidade do alimento, pois alguns surtos estão diretamente relacionados à falta de limpeza e desinfecção dos equipamentos e superfícies. Além disso, a contaminação cruzada pode estar associada à falta de higiene de equipamentos e utensílios de cozinha.

2.4 Desinfecção: Controle de Microrganismo no Ambiente

Rosemberg (1977) ressalta que é importante ter-se bem claro que uma enfermidade não se determina pela simples presença do agente causal. Mas em um controle de enfermidades, os objetivos primordiais são o de impedir a transmissão do agente causal a um novo hospedeiro, ou o de não deixar que o novo hospedeiro desenvolva a infecção (prevenção da ocorrência ou interrupção da evolução da doença).

Segundo Gelman *et al.* (1978) a desinfecção e anti-sepsia, dentro dos níveis de prevenção de doenças transmissíveis, localizam-se no período pré-patogênico, na prevenção primária e insere-se na da categoria saneamento ambiental, como medida preventiva. Isso significa a remoção do meio ambiente de agentes vivos que escaparam de seus reservatórios humanos ou animais e estão aptos para sobreviver, por tempo variável, no ambiente animado ou inanimado.

Os processos de desinfecção têm como objetivo a destruição ou inativação de organismos patogênicos, capazes de produzir doenças, ou de outros organismos indesejáveis. A desinfecção não implica, necessariamente, a destruição completa de todas as formas vivas, embora muitas vezes o processo de desinfecção seja levado até o ponto de esterilização (MEYER, 1994).

Reber (1973), Borneff (1977), Schliesser e Strauch (1981) (*apud* WIEST, 1984) conceituam a desinfecção e anti-sepsia como o controle ou a eliminação dirigida de microrganismos considerados indesejáveis em situações-problema específicas, pela atuação em sua estrutura ou em seu metabolismo, independente de seu estado funcional, visando prejudicar a transmissão desses microrganismos e/ou reduzir a sua dose infectante.

Segundo a portaria RDC N° 216 (BRASIL, 2004), a desinfecção é a operação de redução por método físico ou químico, do número de microrganismos em nível que não comprometa a qualidade higiênico-sanitária do alimento.

Bier (1975) define como anti-séptico toda substância capaz de impedir a proliferação de bactérias, seja inibindo-as (ação bacteriostática), seja destruindo-as (ação bactericida, germicida). O termo anti-séptico deve restringir-se ao emprego em tecidos vivos, e o termo desinfetante ao emprego sobre substâncias inanimadas.

Quanto ao momento da aplicação do desinfetante e anti-séptico na intervenção em situações-problema de saúde diz-se que na prevenção da ocorrência usa-se a desinfecção na suposta ausência, mas iminente presença de agente causal. A prevenção da evolução é feita empregando-se a desinfecção em situações já presentes, em desenvolvimento, nas quais nos deparamos com os agentes causais (WIEST, 1984).

Para Laubush (1971 *apud* MEYER, 1994) alguns dos fatores que influenciam na desinfecção e, portanto, no tipo de tratamento a ser empregado, podem ser resumidos em:

- espécie e concentração do organismo a ser destruído;
- espécie e concentração do desinfetante;
- tempo de contato;
- características químicas e físicas.

A concentração de microrganismos é um fator importante, visto que uma densidade elevada significa uma maior demanda de desinfetante. A aglomeração de organismos pode criar uma barreira para a penetração do desinfetante. A morte de organismos pela ação de um desinfetante, fixando-se os outros fatores, é proporcional à concentração do desinfetante e ao tempo de reação. Deste modo, pode-se utilizar altas concentrações e pouco tempo, ou baixas concentrações e um tempo elevado (MEYER, 1994).

O procedimento de higienização consiste fundamentalmente no uso de detergentes e “sanificantes” (desinfetantes). Embora os detergentes diminuam a carga

bacteriana das superfícies, o objetivo principal do seu uso é a remoção de resíduos orgânicos e minerais. A sanitização, que é a última etapa do procedimento de higienização, visa reduzir microrganismos alteradores e eliminar patogênicos até níveis seguros, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária (MORAES *et al.*, 1997).

Wiestreich e Lechtman (1980) indicaram que há uma grande quantidade de agentes químicos disponíveis para o controle dos microrganismos e, constantemente, aparecem novas substâncias no mercado. Um problema comum enfrentado por todo pessoal que utiliza desinfetantes e anti-séptico seria o de selecionar um deles para o uso. Assim, seria necessária uma grande vigilância na escolha das substâncias utilizadas para interromper o ciclo de doenças no ambiente, sob pena da eficácia ficar prejudicada.

2.5 Desinfetantes: Sensibilidade e Resistência

Rosemberg (1977) já observou que é preciso ter-se presente que qualquer modificação em algum dos elementos do ecossistema (agente causal, hospedeiro e ambiente), desencadeará uma série de adaptações dos demais.

Atualmente pode-se raciocinar que a resistência antimicrobiana é o resultado de uma complexa interação entre agentes antimicrobianos, microrganismos e meio ambiente. Contudo, a versatilidade microbiana de se adequar às condições impostas, representa um formidável mecanismo de defesa. Isto na realidade não deveria representar surpresa, tendo em vista que a história da evolução vem apontando que, todo o organismo vivo busca sempre mecanismos de adequação às suas novas realidades, e a resistência dos microrganismos aos antimicrobianos é uma condição inevitável. A resistência bacteriana aos antimicrobianos não respeita fronteira: seu aparecimento em localidades remotas pode resultar em impacto para o mundo, em curto espaço de tempo, representando atualmente um dos maiores problemas de saúde, em países desenvolvidos e emergentes, em todo mundo. Seu aumento tem ocorrido de forma alarmante nos últimos anos, sendo estimado, que no futuro o uso destes fármacos possa resultar em perda da efetividade (FIOCRUZ, 2005).

Segundo Sander *et al.* (2002) as bactérias desenvolvem resistência após uma exposição prolongada aos desinfetantes, e estudos revelaram que bactérias do mesmo gênero e espécie têm diferentes graus de sensibilidade a um mesmo desinfetante. Além disso, desinfetantes com formulações químicas similares, porém não idênticas, têm eficácia diferente contra as mesmas bactérias.

Concentrações residuais podem agir como um foco para a sobrevivência de microrganismos ou para um gradual ou rápido desenvolvimento de bactérias resistentes a biocidas. Isso reforça o argumento de que os efeitos de biocidas em células bacterianas e, certamente, em outros tipos de microrganismos devem ser examinados sob diferentes concentrações (RUSSEL, 2002).

Nos últimos anos, consideráveis avanços têm sido realizados no entendimento da resposta de diferentes microrganismos aos agentes antimicrobianos. A resistência pode ser uma característica própria do microrganismo (intrínseca) ou adquirida por mutação, mediada por plasmídios ou transposons. A resistência intrínseca tem sido demonstrada por bactérias Gram negativas, esporuladas, micobactérias e, sob certas circunstâncias, *Staphylococcus*. A resistência adquirida ou mediada por plasmídios tem sido associada aos compostos mercuriais e outros sais metálicos. Mais recentemente, resistência adquirida a certos tipos de biocidas (desinfetantes) tem sido observada, notadamente pelos *Staphylococcus* (McDONNELL & RUSSEL, 1999).

Segundo o manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS, 2003) o termo Sensível (S) significa que uma infecção por uma determinada cepa pode ser tratada adequadamente com a dose de agente antimicrobiano recomendada para esse tipo de infecção e espécie infectante, exceto quando contra-indicado. Resistente (R), as cepas resistentes não são inibidas pelas concentrações sistêmicas dos agentes antimicrobianos geralmente atingíveis nos regimes terapêuticos normais e/ou se inserem na faixa de maior probabilidade de ocorrência de mecanismos específicos de resistência microbiana (por exemplo, β -lactamases), além da eficácia clínica não ter sido confiável nos estudos terapêuticos.

A resistência de algumas espécies de microrganismos a desinfetantes específicos varia consideravelmente. Bactérias não-esporuladas são menos resistentes que as formadoras de esporos e formas encistadas e vírus podem ser bastante resistentes (ROSSIN, 1987 *apud* MEYER, 1994).

Guimarães *et al.* (2000), testaram 27 amostras bacterianas isoladas de situações clínicas com o objetivo de avaliar a atividade bactericida de alguns desinfetantes. Os resultados mostraram que todas as amostras testadas foram sensíveis ao hipoclorito de sódio, ao glutaraldeído e à associação de quaternário de amônio-formaldeído-álcool etílico. No entanto, a sensibilidade das amostras ao fenol e ao quaternário de amônio se mostrou variável.

Silva *et al.* (2003), demonstraram, em um estudo a respeito de ocorrência de *E. coli* O157: H7 em vegetais, a sensibilidade aos agentes de desinfecção de verduras, que tanto o cloreto de benzalcônio quanto o hipoclorito e o dicloroisocianurato de sódio são eficazes na destruição de *E. coli* O157:H7 em suspensão, nas concentrações de 100 e 200 ppm, após 30s de contato. Demonstraram ainda que tanto a *E. coli* O157:H7 ATCC 43890, quanto a *E. coli* ATCC 11229, apresentam sensibilidade similar a estes desinfetantes.

Moraes *et al.* (1997), observaram que esporos de bactérias isolados de equipamentos de abatedouro de aves apresentaram diferentes resistências aos sanificantes hipoclorito de sódio, ácido peracético e dicloroisocianurato de sódio, indicando a necessidade de uma seleção criteriosa de agentes químicos para higienização. Comentam ser importante um rodízio entre o hipoclorito de sódio e o ácido peracético, os mais eficientes entre os testados.

Odlaug e Pflug (1976 *apud* MORAES, 1997) mostraram que usando soluções contendo 100 mg/L de cloro residual, em pH 8,0, a partir do hipoclorito de sódio, obtiveram uma redução decimal na população de esporos de *Bacillus subtilis* em 60 minutos . Por outro lado, (ALVARENGA *et al.*, 1991; ANDRADE e SERRANO, 1993, *apud* MORAES, 1997), utilizaram 105 mg/L de Cloro Residual Total (CRT), a partir do hipoclorito de sódio, em pH 8,0, a 30°C. Para se obter 5 Reduções Decimais (RD) na população dos esporos sob avaliação, um deles determinou o tempo de 5 minutos e o outro cerca de 4 minutos .

Chapmann (1998) alerta que a experiência com resistência a antibióticos e a biocidas indica que não há agente químico antimicrobiano que não possa eventualmente desenvolver resistência nos microrganismos. E que essa observação, acoplada com a do decréscimo da taxa de oferecimento de novos grupos químicos biocidas ativos, aumentam a necessidade de saber manejar o risco do desenvolvimento/seleção de resistências bem como responder rapidamente à sua eventual ocorrência.

2.6 O Cloro como Desinfetante

O cloro e seus vários compostos, especialmente os sais de hipoclorito, é um dos sanitizantes empregados com mais sucesso nas indústrias de alimento. São compostos eficientes e de baixo custo, tendo larga aplicação como, por exemplo, na forma de “spray”, para o controle bacteriológico em indústrias de frutas e hortaliças (KIM *et al.*, 1999 *apud* BERBARI *et al.*, 2001).

Quanto à concentração de cloro, segundo Andrade e Macêdo (1996), na “sanificação” (desinfecção) adotada na indústria de alimentos, a concentração de cloro disponível nas soluções devem ser bem mais elevadas do que em outras aplicações dos compostos clorados. Informam que, geralmente, é recomendada uma concentração de 100 mg/L de cloro residual livre quando a desinfecção é efetuada por imersão ou circulação e 200 mg/L quando o processo é aspersão ou nebulização com tempo de contato do cloro de até 15 ou 20 minutos. Também, que existe recomendação do Departamento de Saúde e Bem-Estar dos Estados Unidos da América para que as concentrações das soluções cloradas usadas em superfícies que entram em contato com alimentos não ultrapassem 200 mg/L de cloro livre. No entanto, o uso de soluções mais concentradas, dentro desses limites, se faz necessário, pois existe a possibilidade da limpeza não ter removido completamente os resíduos orgânicos das superfícies, o que inativa parte do cloro livre aplicado.

Segundo Gopal (*apud* BERBARI *et al.*, 2001) a concentração de 100 mg/L de cloro é a mais utilizada em indústrias de alimentos em países como a Austrália e Nova Zelândia.

Dentre os diversos agentes químicos disponíveis para uso como sanificantes (desinfetantes), encontram-se compostos à base de cloro, iodo, amônia quaternária, ácido peracético, água oxigenada, extrato de semente de grape-fruit e clorhexidina. Estes sanificantes (desinfetantes) apresentam uma comprovada eficiência sobre as formas vegetativas bacterianas nas condições recomendadas para uso nas indústrias de alimentos. Nessas condições, normalmente, obtêm-se 5 reduções decimais em 30 segundos de contato na população de células vegetativas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, e de *Escherichia coli* ATCC 11229, quando submetidos ao teste de suspensão (MORAES *et al.*, 1997).

Os organismos diferem na sensibilidade ao cloro: as células bacterianas são as mais sensíveis, esporos bacterianos e de fungos são os menos sensíveis, e alguns parasitos são altamente resistentes (PIROVANI *et al.*, 2006).

As soluções de hipoclorito de sódio disponíveis para comercialização se apresentam em concentrações em torno de 5% (reagente químico) a 2% na forma de água sanitária (ROMÃO, 1998).

A Portaria N° 89, de 25 de agosto de 1994 define como Água Sanitária soluções aquosas a base de hipoclorito de sódio ou cálcio com o teor de cloro ativo entre 2,0% p/p a 2,5% p/p, durante o prazo de validade (máximo de seis meses). O produto poderá conter ainda apenas hidróxido de sódio ou cálcio, cloreto de sódio ou cálcio e carbonato de sódio ou cálcio como estabilizante (BRASIL, 1994).

Soluções concentradas de hipoclorito (100.000 ppm de cloro ativo) são mais estáveis do que as diluídas. Embora a atividade antimicrobiana seja favorecida em pH mais baixo, a estabilidade simultaneamente decai. Para combinar estabilidade durante a estocagem com boa atividade microbocida quando em uso, as soluções de hipoclorito devem ter quantidade adequada de hidróxido de sódio para manter o pH alto durante o armazenamento e uma capacidade de tamponamento de forma que o pH decaia quando diluídas para uso (ROMÃO *op. cit.*).

A ação bactericida dos compostos a base de cloro, com exceção do dióxido de cloro, esta vinculada ao ácido hipocloroso (HClO). Várias teorias tentam explicar os mecanismos de ação dos derivados clorados sobre as formas vegetativas de bactérias. A hipótese mais aceita é a da oxidação de grupos sulfidrilas (-SH) de certas enzimas do metabolismo de carboidratos e inibição de enzimas que participam da oxidação da glicose. Neste caso o ácido hipocloroso (HClO) atravessa a membrana celular, oxida grupos sulfidrilas de certas enzimas que participam da via glicolítica, eliminando a célula. Outras hipóteses são ainda: de que ocorra a descarboxilação oxidativa de aminoácidos, formando nitrilas e aldeídos, ou combinação com proteínas e formação de compostos N-clorados tóxicos; indução da absorção de oxigênio e fosforilação oxidativa conjugada com a quebra de macromoléculas; danos à membrana, dificultando o transporte de carboidratos e aminoácidos e podendo levar ao extravasamento celular; a destruição da síntese protéica; reações com ácido nucléicos, purinas e pirimidinas, ou ainda desequilíbrio metabólico após destruição de enzimas essenciais (MACÊDO, 2004).

Atualmente, a relação benefício/custo da utilização dos derivados clorados como desinfetante ainda é a maior, pois os outros processos disponíveis apesar de serem eficientes ainda têm um custo alto para as condições econômicas do país (MACÊDO, 2004).

2.7 Avaliação da Eficácia do Desinfetante e da Sensibilidade da Bactéria

Segundo Leitão (1984), a avaliação do desempenho dos desinfetantes é bastante complexa, principalmente em função dos inúmeros fatores que poderão afetá-los. Assim, a natureza e tipo de superfícies tratadas, a concentração e natureza dos resíduos a elas aderidos, o tipo de microbiota contaminante na superfície, a concentração e o período de contato do desinfetante com a superfície, seriam apenas algumas das variáveis que poderiam afetar, em maior ou menor grau, a eficácia do desinfetante.

Também para Wiest (1984), fatores como tempo de exposição, natureza e concentração da carga bacteriana, presença de matéria orgânica e materiais (entre outros) são de enorme influência na atividade germicida, o que pode ser melhor avaliado pelo emprego do teste de suspensão. Assim, os resultados obtidos seriam extrapoláveis para a prática dentro de maiores níveis de segurança.

Segundo Guerreiro (1984), o *Staphylococcus aureus* é importante no estudo e combate às doenças infecciosas, pois é uma das bactérias mais resistentes e produz resistência aos antimicrobianos, sendo utilizado como elemento principal de aferição de eficiência.

Quanto aos testes para avaliação da atividade biológica de desinfetantes e anti-sépticos, Reybrouck (1998) indica que existe um grande número deles, com a mesma finalidade: colocar em contato uma solução biocida com o microrganismo com o objetivo de mensurar a atividade antimicrobiana de substâncias ou preparações químicas.

Segundo Holah *et al.* (1998), a adoção dos testes de suspensão para verificação da atividade biológica dos biocidas tem inúmeras vantagens. Eles são relativamente práticos, não requerem extrema especialização nem dispendiosos equipamentos de

laboratório sendo, assim, de baixo custo para realizá-los. Eles já estariam bem descritos quanto a seus limites e possibilidades de avaliação de atividade microbológica, sua repetibilidade e reprodutibilidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras Bacterianas

As 32 amostras de *Staphylococcus aureus* utilizadas no presente estudo foram isoladas de alimentos envolvidos em surtos de DTA no Rio Grande do Sul, Brasil, no período de 2002 a 2006 (Apêndice A, pag. 46 e Apêndice B, pag. 47). O isolamento foi feito no Laboratório Central de Saúde Pública IPB-LACEN/RS, onde permaneceram armazenadas mantidas congeladas (-20°C) em caldo de infusão cérebro e coração (BHI) e glicerol (na concentração de duas partes de amostra e uma parte do glicerol).

3.2 Reativação das Amostras

Para reativação bacteriana, a quantia de 0,2 mL foi retirada, a partir das amostras congeladas, semeada em 5 mL de caldo BHI (MERCK®) e incubada a 35°C, por 24 horas. Alíquotas do caldo foram semeadas em Ágar Baird-Parker (MERCK®), e incubadas 48 horas a 35°C. Foram selecionadas três colônias características de *Staphylococcus* com coloração negra brilhante, forma arredondada, convexa, com bordos regulares, circundadas por um halo branco e outro externo, maior e transparente. As colônias foram então semeadas em caldo BHI, e incubadas 24 horas a 35°C, e submetidas às provas bioquímicas para identificação do gênero *Staphylococcus*.

3.3 Provas Bioquímicas

3.3.1 Teste de Catalase

A partir dos tubos de caldo BHI com crescimento, transferiu-se 1,0 mL para tubos de ensaio e acrescentou-se 1,0 mL de Peróxido de Hidrogênio 3%. Observando-se a ocorrência de borbulhamento imediato o teste era considerado positivo.

3.3.2 Prova de Coagulase em Tubo

A partir dos tubos de caldo BHI com crescimento pipetou-se 0,1mL para tubos de ensaio contendo 0,5 mL de plasma de coelho (LABORCLIN[®]), incubando-os a 35°C por um período máximo de 24h. Após incubação, as culturas com nítida formação de coágulo são consideradas positivas.

3.3.3 Prova de Termonuclease – Tnase

A partir dos tubos de caldo BHI com crescimento, pipetou-se 1,0 mL para tubos de ensaio que foram fervidos a 100°C, por 15 minutos sendo resfriados imediatamente (choque térmico). Inoculou-se a cultura fervida em orifícios previamente preparados em lâminas contendo Ágar Azul de Toluidina DNA. Incubou-se as lâminas a 35°C por 4 h em câmara úmida. Após incubação, procedeu-se a leitura dos resultados, onde as culturas com nítida formação de um halo róseo estendendo-se por cerca de 1 mm das perfurações inoculadas foram consideradas positivas.

3.3.4 Teste de Hemólise

A partir dos tubos de caldo BHI com crescimento semeou-se uma placa de Ágar Sangue de Carneiro (LABORCLIN[®]), posteriormente incubado por 24 h a 35°C, e observou-se a formação de halo de hemólise ao redor das colônias (teste positivo).

3.3.5 Teste de Fermentação de Manitol e Maltose

A partir dos tubos de caldo BHI com crescimento semeou-se em Ágar Manitol e Ágar Maltose (Anexo A, pág. 48), ambos incubados por 24 h a 35°C. A mudança do indicador de púrpura para amarelo, evidenciando a mudança do pH, indicou a fermentação dos referidos açúcares.

3.3.6 Controle de Qualidade das Provas de Identificação

Para todas as provas de identificação bioquímicas realizadas foi utilizado como controle positivo de *Staphylococcus aureus* ATCC 25933. Todas as provas bioquímicas foram realizadas conforme ABNT (1991) e Do Carmo (1998).

3.4 Teste de Sensibilidade do *Staphylococcus aureus* ao Hipoclorito de Sódio.

Confirmada a pureza das linhagens, como *Staphylococcus aureus*, onde 100% apresentaram provas positiva de coagulase em tubo, catalase, prova de termonuclease, teste de hemólise e fermentaram a maltose e o manitol, foram novamente semeadas em Ágar Baird-Parker (DIFCO[®]), incubadas a 24/48 horas a 35°C. Uma colônia foi retirada e colocada em 3mL de caldo BHI (DIFCO[®]), incubada por 24 horas a 35°C, tornando-se a “cultura-teste”.

O hipoclorito de sódio foi obtido de um produto comercializado como água sanitária. A composição apresentava teor de cloro ativo 2,38 %, e pH 11,89 no produto puro e pH 10,09 no produto a 1%, como pode ser conferido no laudo químico (Anexo B, pág. 49).

Para o experimento utilizou-se a concentração de 200 ppm (SILVA JÚNIOR, 2002). A diluição do composto foi feita em água destilada estéril, com o potencial hidrogeniônico (pH) variando de 5 a 6, verificado com papel indicador universal (MERCK®), com potenciômetro (Nova Técnica®, modelo NIpHM) apresentou valores entre 7,58 e 7,70. Na solução final foi verificado o pH de 8 com papel indicador universal, e com potenciômetro o pH de 9,47.

Simulando condições de uso em subconcentração, a quantidade de cloro livre foi de 100 ppm. Para simular ambiente com deficiência na limpeza ambiental precedente à desinfecção, foi usado como matéria orgânica o leite integral UHT, esterilizado em autoclave e adicionado ao teste, na água de diluição do hipoclorito, na quantidade de 1 %, segundo Brasil (1999).

Foi determinado o número de unidades formadoras de colônias da “cultura-teste” através do seguinte procedimento (NEDER, 1992): da diluição 10^{-1} UFC/mL (que corresponde a diluição 1:10) transferiu-se 0,1 mL para placa de Petri com Baird-Parker, que foi devidamente espalhado na superfície da placa com alça de Drigalsky. Da diluição 10^{-2} UFC/mL (que corresponde a diluição 1:100) igualmente transferiu-se 0,1 mL para placa de Petri com Baird-Parker. E assim sucessivamente nas diluições seguintes, que correspondem 1:1000, 1:10 000 até 1: 1000 000 000 . As placas foram incubadas a 35°C por 24/48 horas. Do conjunto de placas, escolheu-se a diluição que apresentou entre 30 e 300 UFC. O dado obtido na contagem corresponde ao número de unidades formadoras da “cultura-teste” (10^9 UFC/mL).

O método de avaliação da atividade antibacteriana foi o de diluição, com teste de suspensão, descrito pelo Ministério da Agricultura e Abastecimento (BRASIL, 1999), com modificações (no tempo de contato e dose infectante das culturas teste). Tubos de ensaio contendo 10 mL do desinfetante na concentração 200 ppm sem e com matéria orgânica e na simulação de subconcentração receberam 0,1 mL da “cultura-teste”. Após os tempos de contato 5, 10, 15 e 30 minutos, através de alça bacteriológica de platina com 10 µL uma alíquota foi retirada e colocada em tubos de ensaio contendo 3 mL do meio de cultura caldo BHI (DIFCO®). Esses tubos foram agitados, incubados a 35°C e as observações feitas com 24, 48, 72 e 96 horas.

A leitura dos tubos de repique contendo BHI indicava os resultados: não-turvação, considerado bactéria inativa (sensível); turvação, bactéria ativa (resistente).

3.5 Análise Estatística

Utilizou-se a técnica não-paramétrica Teste Q de Cochran, específico para variável resposta binária com medidas repetidas ou com pareamento por lote. As comparações múltiplas do Teste Q de Cochran foram também utilizadas. O programa para a análise estatística foi o SPSS Versão 8.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Apresentação e Discussão dos Resultados

Na Tabela 1 pode-se observar os resultados referentes ao número de amostras de *Staphylococcus aureus* sensíveis e resistentes ao hipoclorito de sódio em diferentes concentrações, na ausência e na presença de matéria orgânica.

Tabela 1 – Sensibilidade e resistência das 32 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas no IPB-LACEN/RS entre 2002 e 2006, de alimentos envolvidos em surtos de DTA, frente ao hipoclorito de sódio em duas concentrações, com e sem matéria orgânica, em 30 minutos de contato, usando o teste de suspensão.

Concentração hipoclorito de sódio	Sensíveis	Resistentes
200 ppm Sem matéria orgânica	32	0
200 ppm Com matéria orgânica	5	27
100 ppm (subconcentração)	24	8

Como pode ser visto, quando confrontadas com hipoclorito de sódio na concentração de 200 ppm de cloro livre sem a presença de matéria orgânica, 100% das amostras foram sensíveis. Na mesma concentração, mas na presença de matéria orgânica, 84,4% das amostras foram resistentes e 15,6% delas sensíveis. Na concentração de 100 ppm (considerada subconcentração), 75% apresentaram sensibilidade ou, de outro ângulo, 25% delas foram resistentes.

Também Rossoni (1997), avaliando a eficácia antimicrobiana do cloro sobre as bactérias *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens* e *Staphylococcus aureus*, aderidas à superfícies, obteve como resultado que 100% das amostras foram sensíveis na concentração de 200 ppm de cloro livre. No entanto, Galetti *et al.* (2005), se bem que utilizando método de difusão em ágar (Técnica do poço), mas com a mesma concentração de 200 ppm de cloro livre obtido do hipoclorito de sódio, não obteve

atividade sobre as 25 amostras de *S. aureus* isoladas de ambientes de manipulação de alimento.

Dos resultados aqui encontrados, para explicar a diferença entre o total de amostras sensíveis na presença de 200 ppm e de 100 ppm de cloro livre, parece correto pensar que uma maior concentração de cloro livre na solução deve corresponder (mantendo outros fatores intervenientes constantes) a um aumento da atividade bactericida (desenhos de experimentos realizados para demonstrar essa hipótese serão apresentados mais adiante, no texto). No entanto, nota-se que existe divergência sobre o assunto, como no trabalho apresentado por Rossoni (1997), indicando que na sub-concentração (100 ppm) a ação biocida do hipoclorito de sódio foi a mesma que para a dose recomendada de 200 ppm, divergindo dos resultados encontrados neste estudo.

Sobre a observada resistência do *S. aureus* na presença de matéria orgânica, conforme informam Macêdo & Barra (2002), desinfetantes liberadores de cloro livre têm sua ação reduzida porque o cloro oxida primeiramente a matéria orgânica, reduzindo assim sua disponibilidade para ação antimicrobiana. Anteriormente Lasmanis *et al.* (1953 apud DYCHDALA, 1991), usando solução de hipoclorito com amostras de *Staphylococcus* (coagulase positiva e negativa), observaram que com 3% de leite desnatado não foi obtida a completa morte dos organismos e que, pequenas quantidades de leite exibiram progressivamente a diminuição no efeito da ação bactericida. No entanto, existem opiniões divergentes sobre o fenômeno.

Tanto Mudge *et al.* (1935) quanto Johns (1948), os dois citados por Dychdala (*op. cit.*), na presença de leite nos testes com solução de hipoclorito não encontraram efeitos adversos na ação bactericida do cloro. O segundo autor, usando *E. coli* e *S. aureus* como organismos teste, relatou não haver evidência na redução germicida na presença de leite desnatado e integral, com solução de hipoclorito recém preparada. Em outro estudo experimental, visando a comparação da eficácia da descontaminação prévia de materiais médico-cirúrgicos pelo uso de desinfetantes químicos e pela utilização de água, sabão e ação mecânica, e verificar a interferência da matéria orgânica, Souza *et al.* (1998) constataram que o hipoclorito de sódio 1% exibiu baixa interferência da matéria orgânica (10% de soro fetal bovino), em sua ação germicida sobre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Choleraesuis*.

Para reforçar o que foi observado aqui nesse experimento, também Spaulding (*apud* PIANTA & WIEST, 1986) considerou a limpeza dos instrumentos e outros materiais a serem desinfetados como atitude fundamental para melhor atuação de

diversos produtos químicos, pois matéria orgânica como sangue, plasma e fezes, entre outras, tanto poderiam alterar as moléculas do desinfetante, tornando-o inativo, quanto servirem de barreira mecânica de proteção aos microrganismos.

Em experimentos mais recentes, Bessems (1998) fez semelhante verificação com compostos halogênicos. Adicionando 0,3% de albumina sérica bovina, a concentração desses compostos e o tempo necessários para obter o mesmo efeito de redução logarítmica do microrganismo em ausência de proteína foi de pelo menos o dobro.

A presença da matéria orgânica pode explicar parte do fenômeno de resistência observado. Esse raciocínio, no entanto, não pode ser estendido ao caso da sensibilidade e resistência das amostras de *S.aureus* na concentração de 100 ppm de cloro livre, posto que, ausente a matéria orgânica. Para dar conta da interpretação desse resultado parecem pertinentes os argumentos de SANDER *et al.* (2002) quando informam que ao testar-se a sensibilidade de um microrganismo frente a um desinfetante deve-se levar em consideração todos os fatores que possam interferir na avaliação, principalmente a situação problema específica, isto é, bactérias poderiam apresentar resistência após uma exposição prolongada aos desinfetantes, e isolados bacterianos dentro de um mesmo gênero e espécie têm diferentes graus de sensibilidade a um mesmo desinfetante. Ou ainda, que o mesmo desinfetante com formulações similares, porém não idênticas, apresenta eficácia diferente contra a mesma bactéria.

Com sentido semelhante, pode-se assumir a observação de Lee e Gilbert (1918, *apud* WICKRAMANAYAKE e SPOUL, 1991) para quem a resistência aos antimicrobianos de microrganismos aparentemente similares, pode ser diferente.

Elemento importante de ser anotado é sobre a influência do potencial hidrogeniônico da solução com hipoclorito de sódio, já que o pH da solução trabalhada neste experimento manteve-se no entorno de 9. Como referido por Romão (1998), a forma ativa dos compostos liberadores de cloro é o ácido hipocloroso (HOCl), o qual é formado com o pH da solução de 5 a 8. Os íons hipocloritos (OCl⁻) predominam em soluções alcalinas, e constituem-se a forma antimicrobiana menos ativa. Ou seja, a eficácia do cloro decresceria com o aumento do pH e vice-versa, paralelamente à concentração da forma não dissociada do ácido hipocloroso. Também Andrade e Macêdo (1996) chamam a atenção para a relação entre o pH da solução clorada e a concentração de ácido hipocloroso, pois em pH 10 tem-se apenas 0,3 % desse elemento livre, enquanto que em pH 5,0 esse valor atinge 99,7 %.

Fair *et al.* (1948) e Morris (1966), citados por Dychdala (1991) calcularam a curva de relativa eficácia de desinfecção entre ácido hipocloroso e íon hipoclorito para reduzir a carga de *E. coli*, em temperatura entre 2°C e 5°C, em diferentes níveis de pH, e concluíram que o íon hipoclorito tem 1/80 da potência germicida do ácido hipocloroso.

Dychdala (1991) também concorda que o ácido hipocloroso tem maior atividade antimicrobiana, e que a sua presença depende do pH da solução. Mas argumenta que a experiência mostra que em solução alcalina tanto o hipoclorito de sódio quanto de cálcio, com pequena quantidade de ácido hipocloroso e grande do íon hipoclorito definitivamente possui propriedades bactericidas, sugerindo que esse elemento também deve exercer um papel importante na desinfecção.

No experimento apresentado neste trabalho, manteve-se constante a temperatura com ambiente climatizado no entorno de 25 °C. A temperatura do ambiente e da solução também afeta a atividade antimicrobiana dos compostos liberadores de cloro. Relato realizado por Andrade e Macedo (1996) sobre o inter-relacionamento entre a concentração, o pH e a temperatura foi verificado quando soluções com 20 mg/L de cloro residual livre, numa temperatura de 15°C, reduziram 90 % o número de esporos de *Bacillus cuagulans* em 13 minutos quando o pH foi 7,8. Quando o pH foi ajustado para 6,8 e 4,5 esse tempo diminuiu para 9 e 4 minutos, respectivamente. Aumentando-se a temperatura da solução clorada para 60°C, os tempos reduziram os mesmos 90 % do número de esporos, nos mesmos valores de pH, foram, respectivamente, 1 minuto, 15 segundos e 30 segundos.

Uma consideração sobre a técnica empregada. Em testes de avaliação da atividade antibacteriana de desinfetantes e anti-sépticos, freqüentemente é indicado o uso de inativadores, ou neutralizantes. Eles são substâncias químicas capazes de neutralizar resíduos de antimicrobianos que possam ser carregados junto das subculturas de bactérias suspensas, com a alça bacteriológica, no momento do replique do tubo teste para o tubo contendo meio de cultura sólido usado na verificação da viabilidade do microrganismo. Esses resíduos podem potencialmente interferir na reativação dos organismos, mesmo em doses sub-letais (REYBROUCK, 1979; LANGSRUD & SUNDHEIN, 1998). Essa interferência pode induzir resultados falso-negativos.

Como neutralizador do cloro, a indicação é o tiosulfato de sódio a 0,6 % (REYBROUCK, 1979). No entanto, Eguchi (1991) chama a atenção de que o

tiosulfato de sódio, nesta concentração pode provocar inibição microbiana, principalmente em organismos do gênero *Staphylococcus*. Assim que optou-se realizar a inativação do cloro livre pela técnica de diluição até níveis sub-inibitórios. Esse procedimento foi realizado quando a alíquota retirada com a alça de platina (10 µL) do tubo teste era inoculada em tubo de ensaio contendo 3 mL de meio líquido caldo BHI, isso significou uma diluição de 300 vezes.

Entende-se que esse procedimento foi efetivo, posto que pode ser demonstrado observando a Tabela 2, como por exemplo, quando mesmo na concentração mais elevada de cloro livre, em tempo de contato de 5 minutos, houve crescimento da bactéria. Esse procedimento já havia sido adotado por Avancini (2002), quando, na falta de conhecimento de substâncias que pudessem inativar os princípios químicos ativos do extrato bruto de *Hypericum caprifoliatum*, optou pela prática de “banhar” as bactérias e diluir o extrato em meio líquido.

Também sobre a técnica descrita por Fernandes *et al.* (1999), informa que alguns produtos químicos têm a capacidade de produzir lesões sub-letais em alguns microrganismos, exercendo assim, ação bacteriostática e não bactericida. O prolongamento do período de incubação e o uso de meios apropriados (livre de inibidores) permitem a recuperação das células com lesão fisiológica reversível. Devido a isso, a observação dos tubos de repique foi observado por período de 96 horas.

Na Tabela 2 podem ser observados os resultados referentes à confrontação das amostras com hipoclorito de sódio em diferentes concentrações e presença de matéria orgânica, levando em consideração os tempos de contato.

Tabela 2 – Sensibilidade e resistência das 32 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas no IPB-LACEN/RS entre 2002 e 2006, em alimentos isolados em surtos de DTA, frente ao hipoclorito de sódio em duas concentrações, com e sem matéria orgânica, usando o teste de suspensão e considerando o tempo de contato.

Tempo de Contato		200 ppm sem matéria orgânica	200 ppm com matéria orgânica	100 ppm subconcentração
5 min	S	25	0	7
	R	7	32	25
10 min	S	31	0	11
	R	1	32	21
15 min	S	31	3	15
	R	1	29	17
30 min	S	32	5	24
	R	0	27	8

S= sensibilidade; R= resistência.

Observando os resultados obtidos na concentração de 200ppm de cloro livre sem a presença de matéria orgânica, nos primeiros 5 minutos de contato 78,1% amostras de *Staphylococcus aureus* foram sensíveis. Aos 10 minutos, e também aos 15 minutos, 96,9% das amostras foram inativadas. Quando o tempo de contato foi de 30 minutos, 100% das amostras foram sensíveis.

Quando as amostras de *Staphylococcus aureus* foram confrontadas com o hipoclorito de sódio na concentração de 200 ppm de cloro livre na presença de matéria orgânica, tanto aos 5 quanto aos 10 minutos de contato 100% delas permaneceram ativas. Aos 15 minutos 9,4% das amostras foram sensíveis. Mesmo com 30 minutos de contanto, quando presente a matéria orgânica, apenas 15,6% foram sensíveis ao desinfetante ou, por outro lado, 84,4% apresentaram-se resistentes.

No confronto das amostras com a concentração de 100 ppm, simulando subconcentração do desinfetante, aos 5 minutos de contato observa-se que 21,9% das amostras foram sensíveis. Aos 10 minutos 34,4% das amostras foram sensíveis e aos 15 minutos 46,9% delas. Aos 30 minutos 75% das amostras estavam inativadas, mas, visto de outro modo, 25 % das amostras de *Staphylococcus aureus* ainda estavam viáveis.

Pode-se perceber que quanto maior o tempo de contato, maior a sensibilidade das amostras. Na melhor compreensão desse fenômeno recorre-se a Tortora *et al.* (2000), quando explicam que a taxa de morte esta na dependência da carga populacional, das características microbianas, mas também do tempo de exposição. Essa reflexão igualmente coincide com a de Bessems (1998), segundo quem, a influência do tempo de contato no efeito antimicrobiano de desinfetantes seria relatado com freqüência na literatura. Em se usando uma concentração constante do antimicrobiano no teste, seu efeito aumentaria com o acréscimo de tempo de contato, o que coincide com o que foi encontrado neste experimento.

Verificando a sensibilidade das amostras por tempo de contato e as diferentes concentrações de cloro, mesmo tendo o fenômeno maior tempo de contato maior sensibilidade das amostras ocorrido tanto no módulo experimental com 200 ppm quanto com 100 ppm, observou-se que com concentração de cloro livre maior, menor foi o tempo de contato necessário para que as amostras fossem inativadas. A observação da relação entre concentração e atividade antimicrobiana já havia sido anotada anteriormente.

Mallman *et al.* (1932, *apud* DYCHDALA, 1991) em seu experimento com *S. aureus*, demonstraram que o aumento do cloro livre na solução de hipoclorito em

potencial hidrogeniônico constante de 9 diminui o tempo no incremento da taxa bactericida. Com 2 ppm de cloro livre produziu a morte do microrganismo em 5 minutos, à 1,2 ppm em 10 minutos enquanto que à 0,3 ppm não eliminou completamente o organismo em 30 minutos. Rudolph *et al.* (1941, *apud* DYCHDALA, 1991) testaram uma solução de hipoclorito, em pH constante de 10 e temperatura de 20°C. Os tempos necessários para promover a morte de 99,9 % dos esporos de *Bacillus metiens* foram: 31 minutos a 500 ppm, 63,5 minutos a 100 ppm e de 121 minutos a 25 ppm. Eles calcularam que quadruplicando a concentração da solução de hipoclorito resulta em 50 % a redução do tempo de morte e, dobrando a concentração reduz em 30 % o tempo de morte.

4.2 Apresentação dos Resultados Estatísticos

A avaliação estatística (Anexo C, pág. 51) levou em consideração a relação entre resultados sensível e resistente *versus* concentração de cloro livre *versus* presença/ausência de matéria orgânica *versus* tempo de contato [R ou S, 200 ppm de hipoclorito de sódio sem matéria orgânica (SM), 200 ppm de hipoclorito de sódio com matéria orgânica (CM), 100 ppm (subconcentração - SB), nos tempos de 5, 10, 15 e 30 minutos de contato]. Deste modo, obteve-se a configuração de 12 níveis de tratamentos, como exemplo: SM5, SM10,, SB15.

A análise estatística realizada através do Teste Não-Paramétrico (Q) de Cochran para variáveis nominais dicotômicas avaliou a proporção de amostras resistentes e sensíveis, com nível de significância ($p \leq 0,05$), e concluiu que deve haver diferença significativa ($p < 0,0001$) entre elas.

Para observar onde essas diferenças estavam, foram realizadas comparações múltiplas através do Teste Não-Paramétrico de Cochran (Q), considerando apenas as comparações entre tempos para um mesmo tratamento ou entre tratamentos com um mesmo tempo.

Indicando pelo modo mais fácil de anotar, os níveis de tratamento onde não foram encontradas diferenças significativas são os seguintes: SM5 e SB30; SM10 e SM15; SM10 e SM30; SM15 e SM30; CM5 e CM10; CM5 e CM15; CM5 e CM30;

CM10 e CM15; CM10 e CM30; CM15 e CM30; CM15 e SB5; CM30 e SB5; SB5 e SB10; SB10 e SB15.

Chama-se a atenção para o fato de que as relações exclusivamente matemáticas podem não ser absolutas na interpretação dos resultados. Pode-se citar exemplos da Tabela 2, onde SM5 *versus* SB30, ou SM10 e SM30 que estatisticamente não apresentaram diferença significativa. No entanto, o sanitarista/higienista pode ter um olhar diferente sobre o resultado. Mesmo que a diferença de uma amostra, para o “n” 32 usado neste trabalho não indique matematicamente diferença significativa, o higienista deve pensar que uma única amostra resistente, tem grande importância pois, pode colocar em risco a segurança do alimento e a conseqüente saúde de comensais.

5 CONCLUSÕES

As 32 amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas em alimentos envolvidos em surtos de toxinfecções alimentares foram sensíveis ao hipoclorito de sódio na concentração de 200 ppm de cloro livre, na ausência de matéria orgânica. Cem por cento delas foram inativadas com 30 minutos de contato.

A presença de matéria orgânica 1% de leite integral aumentou a resistência das amostras de *Staphylococcus aureus*, ou diminuiu a atividade antimicrobiana do hipoclorito de sódio. Com 30 minutos de contato frente às mesmas 200 ppm de cloro livre, ainda 84,4% delas permaneceram ativas.

A sensibilidade das 32 amostras de *Staphylococcus aureus* foi menor na concentração de 100 ppm de cloro livre do que na concentração de 200 ppm. Como exemplo, com 30 minutos de contato enquanto na concentração de 200 ppm de cloro livre 100% das amostras estavam inativadas, e frente 100 ppm no mesmo tempo de contato ainda 25% delas permaneciam viáveis.

O número de amostras sensíveis de *Staphylococcus aureus* aumentou com o também aumento do tempo de contato com o cloro livre. A influência do tempo de contato sobre o número de amostras sensíveis foi maior na confrontação com 200 ppm de cloro livre na presença de matéria orgânica 1% de leite integral e com 100 ppm, do que frente a 200 ppm de cloro livre.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, N.J. de; MACÊDO, J.A.B. de. **Higienização na indústria de alimentos**. São Paulo : Livraria Varela, 1996. 182p.
- ANDRADE, G.P; ZELANTE, F. Ocorrência simultânea de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos nas mãos, boca e fezes em portadores assintomáticos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v.23, n. 4, 1989.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Comitê Brasileiro de Alimentos e Bebidas. **Alimentos-Contagem de Staphylococcus aureus em placas Método de ensaio**. Rio de Janeiro, 1991. 4p.
- AVANCINI, César A. M. **Saneamento Aplicado em Saúde e Produção Animal: Etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de hipericum caprifoliatum cham. E schlecht-Hypericaceae(guttiferae)- (escadinha/ sinapismo) para uso como desinfetante e antisséptico**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, na especialidade de Medicina Veterinária Preventiva). 2002. 308 f. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias / Faculdade de Veterinária / Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- BERBARI, S.A.; PASCHOALINO, J.E.; SILVEIRA, N.F. A. Efeito do cloro na água de lavagem para desinfecção de alface minimamente processada. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 21, n. 2, p. 197-201, 2001.
- BESSEMS, E. The efect of practical conditions on the efficacy of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 41, p. 177-183, 1998.
- BIER, Otto. **Bacteriologia e imunologia em suas aplicações à medicina e à higiene**. 16. ed. São Paulo: Melhoramentos / Editora da U.S.P, 1975. 608 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria n° 15**, de 23 de agosto de 1988. Diário Oficial da União, p. 17041-17043, segunda-feira, 5 de setembro de 1988.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria n° 89**, de 25 de agosto de 1994. Legislação em Vigilância Sanitária. [**Diário Oficial da República Federativa do Brasil** Poder Executivo, Brasília, DF, s.d]. Disponível em : < <http://e-legis.bvs.br/leisref/publi>> Acesso em: 24 jul. 2004.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Defesa Animal. **Métodos de análises microbiológicas para alimentos**, Coordenação de Laboratório Animal, 1999. Cap. 31.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária(ANVISA), **Resolução RDC n.12**, de 02 de janeiro de 2001, Regulamento Técnico sobre os

padrões microbiológicos para alimentos. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 20 jul. 2005.

BRASIL.Ministério da Saúde. **Resolução RDC N° 216**, de 15 de Setembro de 2004. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: < [http/ www.e-legis.bvs.br/leisref](http://www.e-legis.bvs.br/leisref)> Acesso em: 24 jul. 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Boletim Eletrônico Epidemiológico.Ano 5 , n ° 06 de 28 de dezembro de 2005**. Disponível em : <[http/ www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)> Acesso em: 08 nov. 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar.Disponível em:<[http/www.saude.gov.br/svs](http://www.saude.gov.br/svs)> Acesso em: 08 nov. 2006.

CARMO, L.S. **Manual para elucidação de surtos de toxinfecção alimentar por enterotoxina estafilocócica**. Belo Horizonte: Fundação Ezequiel Dias (FUNED/MG), 1998. 23 p.

CHAPMAN, J. S. Characterizing bacterial resistance to preservatives and disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 41, p. 241-245, 1998.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI/NCLS). Methods for dilutions antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standart - Six edition. **NCCLS Document M7-A6**, ISBN 1-56238-486-4, Pennsylvania/USA, 2003.

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

DYCHDALA, G.R. Chlorine and chlorine compounds. In: BLOCK, S.S. **Disinfection, sterilization and preservation**. 4. ed. Philadelphia-London : Lea & Fabiguer, 1991. p. 131 - 151.

EGUCHI, S.Y. Técnicas de laboratório para avaliação de desinfetantes. In: BOEHRINGER DE ANGELI QUÍMICA E FARMACÊUTICA LTDA; UNION CARBIDE DO BRASIL LTDA (patrocinadores). **I Encontro Técnico Sobre Novas Tecnologias em Sanitização Agroindustrial**. São Paulo, 25 e 26 de julho de 1991. (mimeo)

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ/LRNCEB/LAB). **Manual de Procedimentos para Determinação da Suscetibilidade Antimicrobiana em Enterobactérias**. 2005. (Um CD ROOM)

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

GALETTI, F.C. S.; AZEVEDO, A.P.; AZEVEDO, R.V. P. Avaliação do perfil de sensibilidade a anticépticos, desinfetantes e antibióticos (resistograma), de bactérias

isoladas de manipuladores, superfícies de contato e alimentos, durante o processo de produção de frango xadrez e alcatra ao molho. **Higiene alimentar**, São Paulo, v.19, p. 91-99, 2005.

GELMAN, A.C.; CLARK, E.G.; OMRAM, A.R. A Prevenção da doença transmissível. In: LEAVELL, H.R. e CLARK, E.G. **Medicina preventiva**. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil; Rio de Janeiro: FENAME, 1978. Parte II.5, p.133-181.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo : Livraria Varela, 2001.

GUERREIRO, Milton G. et al. **Bacteriologia Especial**: com interesse em saúde animal e saúde pública. Porto Alegre : Editora Sulina, 1984. 492p.

GUIMARÃES, M.A. et al. Desinfectant and antibiotic activities: a comparative analysis in Brazilian Hospital Bacterial Isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**. São Paulo, v.31, n.3, June 26, 2000. Disponível em: <www.scielo.br>

HOLAH, J.T.; LAVAUD, A.; PETERS, W.; DYE, K.A.. Future techniques for disinfectant efficacy testing. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v.41, p.273-279, 1998.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS OF THE INTERNATIONAL UNION OF MICROBIOLOGICAL SOCIETIES (ICMSF). **APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos**: análise de perigos e pontos críticos - qualidade e a segurança microbiológica de alimentos. São Paulo : Livraria Varela, 1997.

LANGSRUD, S.; SUNDHEIN, G. Factors influencing a suspension test methods for antimicrobial activity of disinfectants. **J. Appl. Microbiol**, Oxford, v.85, n.6. p.1006 - 1012, 1998.

LEITÃO, M.F.F. Avaliação da atividade germicida e desempenho de desinfetantes usados na indústria de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, p.1-16, jan./mar. 1984.

LEMONS, M.P. **Contribuições da ergonomia na melhoria da qualidade higiênico-sanitária de refeições coletivas: um estudo de caso**. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Santa Catarina, 1999.

MACÊDO, J. A. B. **Águas & Águas**. 2. ed. Belo Horizonte: CRQ-MG, 2004. 977p.

MACÊDO, J.A. B.; BARRA, M.M. O estado da arte do processo de desinfecção pelo uso de derivados clorados, em função do pH. **Leite & Derivados**, São Paulo, v. 65, p. 26-30, 2002.

MCDONNELL, G.; RUSSEL, D. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v.12, n.1, p. 147-179, 1999.

MEYER, S.T. Chlorine use in water disinfection, trihalomethane formation, and potential risks to public health. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro [online]. 1994,

v.10, n.1 [cited 2006-10-10], pp. 99-110. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102311X1994000100011&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0102-311X. Acesso em: 10 out. 2006.

MESQUITA, M.O. de et al . Microbiological quality in the roast chicken process in nutritional and nourishment unit. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612006000100031&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: 30 out. 2006.

MORAES, M.S.V; ANDRADE,N.J.; CHAVES, J.B.P; PASSOS,F.J.V. & GOMIDE, L.A.M. Isolamento de esporos de equipamentos de abatedouros avícolas e avaliação de sua resistência a sanificantes químicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas v.17, n.3. p. 1-12, set/dez 1997.

NASCIMENTO, F.C.A. Aspectos sócio-econômicos das doenças veiculadas por alimentos. **Revista Nutrição em Pauta**, São Paulo, jan./fev., 2000. **Site:**<http://www.nutricaoempauta.com.br> Acesso em: 10 nov. 2006.

NEDER, R.N. **Microbiologia: manual de laboratório**. São Paulo: Nobel, 1992. 138p.

PIROVANI, M. E.; GÜEMES, D. R.; PIAGENTINI, A. M.. **Lavado desinfección con soluciones cloradas: Una etapa para mejorar la calidad microbiológica de vegetales de hoja frescos cortados**. I Simpósio Ibero-Americano de Vegetais Frescos Cortados, San Pedro, SP, Brasil, abr. 2006.

PIANTA, C.; WIEST, J.M. Influência da matéria orgânica na desinfecção por iodofores em mastite bovina causada por *Staphylococcus aureus*. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, Porto Alegre, v. 14, p. 79-85, dez. 1986.

PINTO, A.T. **Ocorrência de enfermidades bacterianas transmitidas por alimentos no estado do Rio Grande do Sul**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). 1999. 149f. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias / Faculdade de Veterinária / Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

RADDI, M. S. G.; LEITE, . Q.F.; MENDONÇA,C.P. *Staphylococcus aureus*: Portadores entre manipuladores de alimentos. **Revista de Saúde Pública**. São Paulo, v. 22, p. 36-40, 1988.

REYBROUCK, G. Efficacy of inactivators against 14 disinfectant substances. **Zentralblatt Bakteriologie und Hygiene**, I, Abt. Orig. B 168, p. 480-492, 1979.

REYBROUCK, G. The testing of disinfectants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 41, p.269-272, 1998.

RIO GRANDE DO SUL. Secretaria Estadual da Saúde. **Distribuição anual dos surtos investigados de doenças transmitidas por alimentos segundo agente etiológico, RS, 1987-2000**,[Porto Alegre]: CCDTA/SES/RS, 2000. Disponível em: www.saude.rs.gov.br. Acesso em: 20 out. 2006.

ROMÃO, C.M.C.A. Desinfecção esterilização química. In: TEIXEIRA, P. e VALLE, S. (org). **Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar**. Rio de Janeiro : FIOCRUZ, 1998.

ROSEMBEERG, R.J. **Princípios de epidemiologia**. Rio de Janeiro: Centro Panamericano de Febre Aftosa, 1977.

ROSSONI, E. M. M. **Efeito de sanitizantes utilizados em indústrias de alimentos sobre bactérias aderidas a superfície de aço inoxidável**. Dissertação (Mestrado) 1997, 113 p. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente/Faculdade de Agronomia/Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

RUSSEL, A.D. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 49, p. 597-599, 2002. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/cgi/reprint/49/4/597>>. Acesso em: 28 out. 2006.

SANDER, J.E. et al. Investigation of resistance of bacteria from commercial poultry sources to commercial disinfectants. **Avian Diseases**, Washington, v. 46, p. 997-1000, 2002.

SILVA JR, E.A. **Manual de controle higiênico sanitário em alimentos**. São Paulo: Varela, 2002. 479 p.

SILVA, Neusley et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 277 p.

SILVA, N.; SILVEIRA, N.F.A.; YOKOYA, F.; OKAZAKI, M.M. Ocorrência de *Escherichia coli* 0157:H7 em vegetais e resistência aos agentes de desinfecção de verduras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.23, p. 167-173, maio/ago. 2003.

SOUZA, A.C. S.; PEREIRA, M.S.; RODRIGUES, M.A. V.. Descontaminação prévia de materiais médico-cirúrgicos: estudo da eficácia de desinfetantes químicos e água e sabão. **Revista Latino-americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 3, p. 95-105, 1998.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre : Artmed, 2000. Cap. 7 - Controle do crescimento microbiano, p. 182-206.

TRABULSI, L.R. et al. **Microbiologia**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 1999. 590 p.

WICKRAMANAYAKE, G.B.; SPOUL, O.J. Kinetics of inactivation of microorganisms. In BLOCK, S.S. Definition of terms. In: BLOCK, S.S.. **Desinfection, sterilization and preservation**. Fourth Edition. Philadelphia/London : Lea & Febiger, 1991. Part I, Chapter 3.

WIEST, J.M. Desinfecção e desinfetantes. In: GUERREIRO, M. ; OLIVEIRA, S.J.; SARAIVA, D. et al. **Bacteriologia especial: com interesse em saúde pública e saúde animal**. Porto Alegre : Sulina, 1984. p. 51-66.

WIESTREICH, L.; LECHTMAN, M. **Microbiologia das doenças humanas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980.

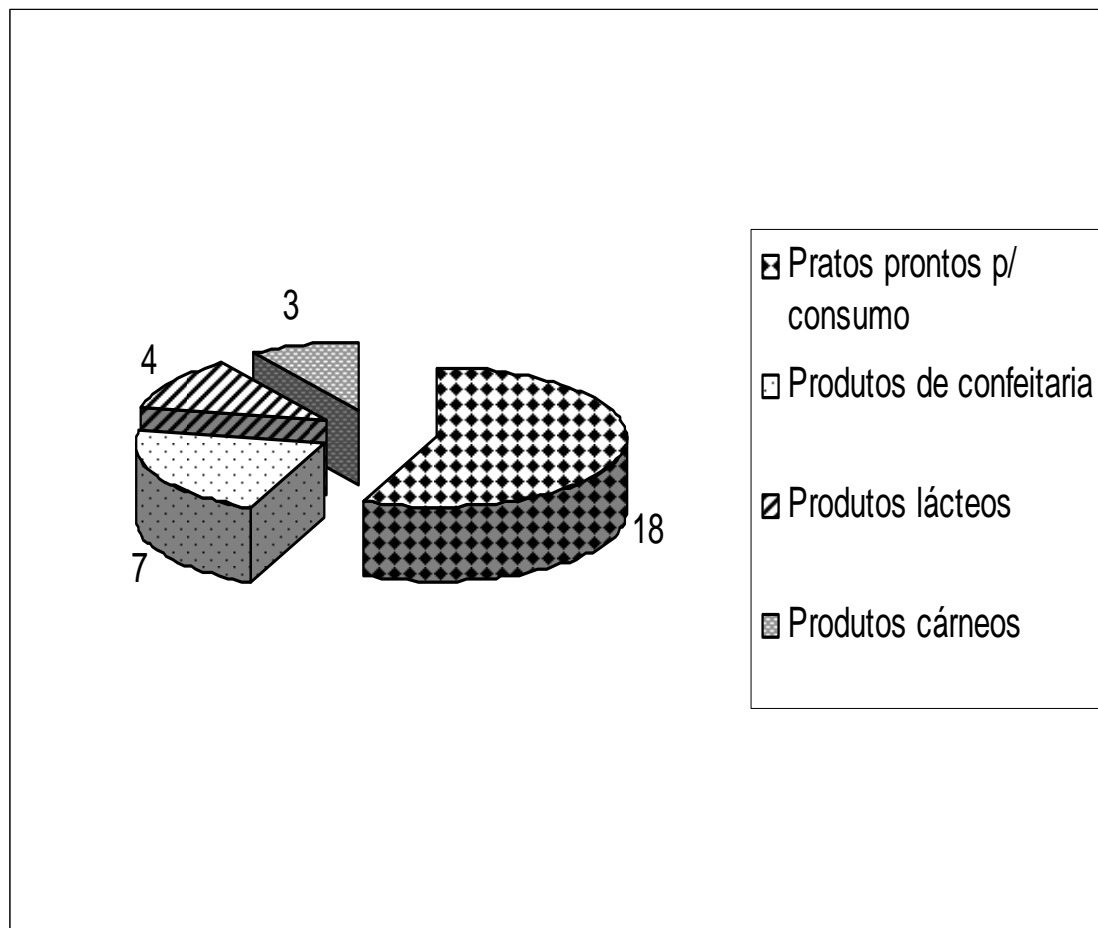
WORLD HEALTH ORGANIZATION: **Food Safety and foodborne illness**. Jan. 2002. (Fact sheet, 237). Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre>. Acesso em: 20 de maio de 2005.

APÊNDICE A - Alimentos envolvidos em surtos de intoxicação no Rio Grande do Sul de 2002 a 2006, de onde foram isolados as amostras de *Staphylococcus aureus* usadas nesta pesquisa.

Nº. e ano da Amostra	Data início dos sintomas	Tipo de alimento	Doentes(n)
1/02	18.08.02	bolo caseiro	6
2/02	29.08.02	polenta	2
3/02	29.08.02	torta folhada	2
4/02	29.08.02	creme de morango	2
5/02	06.09.02	queijo colonial	4
6/02	12.10.02	churrasco de gado galetto e porco	106
7/02	12.10.02	maionese	106
8/02	15.10.02	carne moída	5
9/02	20.10.02	bolo caseiro	48
10/03	27.12.02	maionese com batata	9
11/03	30.12.02	queijo	5
12/03	09.03.03	bolo	58
13/03	28.03.03	lasanha	2
14/03	22.05.03	arroz com carne	5
15/03	22.05.03	polenta com carne	5
16/03	14.07.03	leite integral	3
17/03	27.07.03	molho branco	3
18/03	27.07.03	filé à parmegiana	3
19/03	06.09.03	bolo	30
20/03	28.09.03	salada de fruta com creme de leite	2
21/03	05.10.03	carne moída	31
22/03	05.10.03	carne de churrasco	31
23/03	15.10.03	pão de queijo	-
24/03	29.11.03	salada de maionese	75
25/03	28.11.03	maionese	47
26/03	04.12.03	bolo de chocolate	29
27/03	04.12.03	arroz	29
28/03	07.12.03	carne bovina	150
29/03	07.12.03	salada de maionese	150
30/03	08.12.03	queijo colonial	3
31/05	01.12.05	galinha desfiada	24
32/06	30.04.06	lasanha 4 queijos	2

(-) – sem dados do número de doentes.

APÊNDICE B – Alimentos envolvidos em surtos de intoxicação no Rio Grande do Sul de 2002 a 2006, de onde foram isolados as amostras de *Staphylococcus aureus* usadas nesta pesquisa, agrupados segundo Resolução RDC nº. 12/2001.



ANEXO A – Meio de cultura utilizado para identificação bioquímica dos *Staphylococcus aureus*.

Ágar FAM (Fermentação da Maltose ou Manitol)

Proteose de peptona- 10,0 g

Extrato de carne- 1,0g

NaCl- 5,0g

Púrpura de Bromocresol- 0,02g

Ágar- 15,0g

Açúcar- 20,0g

Adicionar: Sol de Maltose ou Manitol a 10% esterilizado por filtração conforme abaixo:

Preparo do Meio:

Suspender os ingredientes em 1 litro de água destilada e aquecer até completa dissolução. Ajustar o pH para 6,8+- 0,2 e distribuir 80,0 mL por frasco. Autoclavar a 121°C por 15 minutos. Guardar o meio em geladeira. Quando usar, dissolver o ágar em banho-maria e deixar esfriar até 45 °C +/- 50 °C. Em seguida, adicionar para cada 80mL de meio fundido, 20mL da solução de açúcar esterilizada anteriormente por filtração. Distribuir o ágar em placas de Petri (20 mL em cada placa).

Tempo de uso (validade): +/- 1 mês

ANEXO B – Laudo da Análise da Água Sanitária



Secretaria da Saúde do Rio Grande do Sul
Instituto de Pesquisas Biológicas
Laboratório Central de Saúde Pública - IPB/LACEN/RS
 Av. Ipiranga, 5.400 – Bairro Jardim Botânico – Porto Alegre/RS
 CEP 90610-000 – Fone/fax: (51) 3288-4000 – E-mail: lacen@fepps.rs.gov.br

**RELATÓRIO DE ENSAIO**

MODALIDADE DA ANALISE: Orientação.
 DATA DE ENTRADA: 15/05/06
 SOLICITANTE: Jane Mari Corrêa Both.
 NOME DO PRODUTO: Água sanitária Q Boa. MARCA: Q boa.
 FABRICANTE: Indústrias Anhembí S. A.
 ENDEREÇO: Rua André Rovai, 481- Centro - Osasco – SP.
 REGISTRO: 3.1940.0002.003 - 7 LOTE: 1-780. 18:01
 DATA DE FABRICAÇÃO: 19/04/2006 VALIDADE: 6 meses.
 UNIDADES/AMOSTRAS: Uma. VOLUME: 1L

UNIDADE ANALÍTICA: Seção de Físico - Química - Laboratório de Domissaneantes.

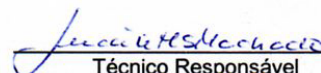
Características Gerais do Produto: O produto consiste em um líquido amarelo pálido com odor característico, acondicionado em frasco plástico opaco e vedado com tampa rosqueada.

Nome do Ensaio: Teor de cloro ativo.
Referência: Portaria 89 de 25/08/94.
Valor de Referência: (2,0 a 2,5) % p/p.
Resultado: 2,38 % p/p.

Nome do Ensaio: pH do produto puro.
Referência: Portaria 89 de 25/08/94.
Valor de Referência: menor ou igual a 13,5
Resultado: 11,89

Nome do Ensaio: pH do produto a 1%.
Referência: Portaria 89 de 25/08/94.
Valor de Referência: menor ou igual a 11,5.
Resultado: 10,09

Parecer técnico: Amostra de acordo com a legislação vigente quanto aos parâmetros físico-químicos analisados.



Técnico Responsável
Judite M. S. Machado
 Mat. 21815305
 CRQ V 06290123

CONCLUSÃO: Amostra de acordo com a legislação vigente.



Chefe da Divisão de Análise de Produtos

Tatiana Tramontin
 Matr. 81.0
 CRQ V 05302378

Concluído em: 19/05/06.

ANEXO C – Análise Estatística

Utilizou-se a técnica não-paramétrica Teste Q de Cochran, específico para variável resposta binária com medidas repetidas ou com pareamento por lote, como neste caso. No entanto, o Teste Q de Cochran não testa os efeitos principais de cada fator, pois o teste é delineado para apenas um fator. Deste modo, combinamos os 3 níveis do Tipo de Tratamento (SM, CM e SB) com os 4 níveis de Tempo, porém considerando o pareamento por lote. Foram então comparados 12 níveis de combinações dos tratamentos.

As comparações múltiplas do Teste Q de Cochran foram também utilizadas, no entanto, as combinações de tratamento e tempo que não precisam ser comparadas podem ser desconsideradas. Assim, por exemplo, não é necessário verificar a comparação SM5 com CM10, isto é, devemos apenas considerar comparações entre tempos para um mesmo tratamento ou entre tratamentos com o mesmo tempo.

TESTE NÃO-PARAMÉTRICO Q DE COCHRAN

Através do Teste Não-Paramétrico Q de Cochran para variáveis nominais dicotômicas, podemos concluir que deve haver diferença significativa entre os 12 tratamentos ($p < 0,0001$), em relação à proporção de amostras resistentes.

Comparação		Diferença	Dms	Conclusão
A vs	B	RmA-RmB		
SM5	SM10	0.1875	0.1576	S
SM5	SM15	0.1875	0.1576	S
SM5	SM30	0.2188	0.1576	S
SM5	CM5	0.7813	0.1576	S
SM5	CM10	0.7813	0.1576	S
SM5	CM15	0.6875	0.1576	S
SM5	CM30	0.6250	0.1576	S
SM5	SB5	0.5625	0.1576	S
SM5	SB10	0.4375	0.1576	S
SM5	SB15	0.3125	0.1576	S
SM5	SB30	0.0313	0.1576	NS
SM10	SM15	0.0000	0.1576	NS
SM10	SM30	0.0313	0.1576	NS

SM10	CM5	0.9688	0.1576	S
SM10	CM10	0.9688	0.1576	S
SM10	CM15	0.8750	0.1576	S
SM10	CM30	0.8125	0.1576	S
SM10	SB5	0.7500	0.1576	S
SM10	SB10	0.6250	0.1576	S
SM10	SB15	0.5000	0.1576	S
SM10	SB30	0.2188	0.1576	S
SM15	SM30	0.0313	0.1576	NS
SM15	CM5	0.9688	0.1576	S
SM15	CM10	0.9688	0.1576	S
SM15	CM15	0.8750	0.1576	S
SM15	CM30	0.8125	0.1576	S
SM15	SB5	0.7500	0.1576	S
SM15	SB10	0.6250	0.1576	S
SM15	SB15	0.5000	0.1576	S
SM15	SB30	0.2188	0.1576	S
SM30	CM5	1.0000	0.1576	S
SM30	CM10	1.0000	0.1576	S
SM30	CM15	0.9063	0.1576	S
SM30	CM30	0.8438	0.1576	S
SM30	SB5	0.7813	0.1576	S
SM30	SB10	0.6563	0.1576	S
SM30	SB15	0.5313	0.1576	S
SM30	SB30	0.2500	0.1576	S
CM5	CM10	0.0000	0.1576	NS
CM5	CM15	0.0938	0.1576	NS
CM5	CM30	0.1563	0.1576	NS
CM5	SB5	0.2188	0.1576	S
CM5	SB10	0.3438	0.1576	S
CM5	SB15	0.4688	0.1576	S
CM5	SB30	0.7500	0.1576	S
CM10	CM15	0.0938	0.1576	NS
CM10	CM30	0.1563	0.1576	NS
CM10	SB5	0.2188	0.1576	S
CM10	SB10	0.3438	0.1576	S
CM10	SB15	0.4688	0.1576	S
CM10	SB30	0.7500	0.1576	S
CM15	CM30	0.0625	0.1576	NS
CM15	SB5	0.1250	0.1576	NS
CM15	SB10	0.2500	0.1576	S
CM15	SB15	0.3750	0.1576	S
CM15	SB30	0.6563	0.1576	S

CM30	SB5	0.0625	0.1576	NS
CM30	SB10	0.1875	0.1576	S
CM30	SB15	0.3125	0.1576	S
CM30	SB30	0.5938	0.1576	S
SB5	SB10	0.1250	0.1576	NS
SB5	SB15	0.2500	0.1576	S
SB5	SB30	0.5313	0.1576	S
SB10	SB15	0.1250	0.1576	NS
SB10	SB30	0.4063	0.1576	S
SB15	SB30	0.2813	0.1576	S

Através do teste de comparações múltiplas acima, ao nível de significância de 5%:

Podemos concluir que a proporção de amostras resistentes do tratamento Sem Matéria Orgânica aos 5 minutos (SM5) deve diferir significativamente da proporção de amostras resistentes do tratamento Com Matéria Orgânica aos 5 minutos (CM5) e do tratamento Sub-Concentração aos 5 minutos (SB5).

Podemos concluir que a proporção de amostras resistentes do tratamento Sem Matéria Orgânica aos 10 minutos (SM10) deve diferir significativamente da proporção de amostras resistentes do tratamento Com Matéria Orgânica aos 10 minutos (CM10) e do tratamento Sub-Concentração aos 10 minutos (SB10).

Podemos concluir que a proporção de amostras resistentes do tratamento Sem Matéria Orgânica aos 15 minutos (SM15) deve diferir significativamente da proporção de amostras resistentes do tratamento Com Matéria Orgânica aos 15 minutos (CM15) e do tratamento Sub-Concentração aos 15 minutos (SB15).

Podemos concluir que a proporção de amostras resistentes do tratamento Sem Matéria Orgânica aos 30 minutos (SM30) deve diferir significativamente da proporção de amostras resistentes do tratamento Com Matéria Orgânica aos 30 minutos (CM30) e do tratamento Sub-Concentração aos 30 minutos (SB30).

OBS1: O texto das comparações múltiplas acima é um exemplo de como interpretar as comparações efetuadas, ou seja, foi escolhido para exemplo fixar o tempo e variar os tratamentos. A decisão de o que se quer comparar fica a cargo do pesquisador.

OBS2: Os dois fatores Grupo (Sem Matéria Orgânica, ...) e Tempo (5 minutos, ...) foram combinados num só fator com doze níveis (SM5, SM10, ..., SB15). As

codificações utilizadas para Grupo foram SM (Sem Matéria Orgânica), CM (Com Matéria Orgânica) e SB (Sub-Concentração).

O programa utilizado para a análise estatística foi o SPSS Versão 8.

A bibliografia indicada para o teste utilizado é “BIOSTATISTICAL ANALYSIS” do autor JERROLD H. ZAR; PRENTICE-HALL, INC.