



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



**MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOMÉDICAS, especialidade de Biologia
Molecular em Medicina Tropical e Internacional**

**Implementação do método de suspensão quantitativa para
avaliar a actividade bactericida de desinfectantes químicos, de
acordo com a Norma Europeia EN 1040**

Fábia Araújo Gomes



UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
INSTITUTO DE HIGIENE E MEDICINA TROPICAL



Implementação do método de suspensão quantitativa para avaliar a actividade bactericida de desinfectantes químicos, de acordo com a Norma Europeia EN 1040

Fábia Araújo Gomes

*Tese apresentada para a obtenção do
grau de Mestre em Ciências Biomédicas,
especialidade de Biologia Molecular em
Medicina Tropical e Internacional.*

Orientadora Interna:

Prof^a Doutora Maria Amélia Grácio
Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT)

Orientadora Externa:

Doutora Isabel Castanheira
Instituto Nacional de Saúde Dr^o Ricardo Jorge (INSA, I.P.)

2010

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pais e irmãos, pela presença, preocupação e carinho sempre constantes, pelo apoio incondicional e pelo encorajamento e conselhos prestados no decurso de todo o Mestrado, tornando possível a realização desta etapa importante da minha vida.

Agradeço à Doutora Isabel Castanheira, Investigadora Principal do Departamento de Alimentação e Nutrição do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, I.P. (INSA, I.P.), o facto de ter aceitado ser minha orientadora científica externa, o tempo que dedicou à orientação da presente dissertação e os preciosos ensinamentos e conhecimentos que me transmitiu, fruto da sua longa experiência e formação. O meu sincero obrigado pela sua disponibilidade permanente, pela atenta revisão crítica do presente trabalho, bem como pelas sugestões efectuadas. Em especial, desejo agradecer profundamente a confiança depositada no meu desempenho, os conselhos, a afabilidade e, sobretudo, o carinho com que me acolheu e integrou.

Agradeço à Engenheira Cristina Belo Correia do INSA, I.P., o facto de me ter recebido no Laboratório de Microbiologia da Unidade de Referência do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P., onde realizei todo o trabalho experimental. O meu especial obrigado pela sua simpatia.

Agradeço à Engenheira Carla Maia do INSA I.P., toda a disponibilidade, colaboração laboratorial, apoio técnico prestado e os conhecimentos que me transmitiu ao longo do trabalho experimental. O meu sincero obrigado pela sua preocupação e orientação.

À Doutora Rosália Furtado do INSA, I.P. desejo manifestar o meu agradecimento pelas palavras de apoio e incentivo, disponibilidade e ensinamentos valiosos. O meu especial obrigado pelo seu optimismo e sugestões importantes.

A todos os técnicos e auxiliares do Laboratório de Microbiologia do INSA, I.P. deixo o meu obrigado pelas colaborações que prestaram de diversas formas e pelo excelente ambiente de laboratório a que se assiste, tornando-o propício a qualquer realização de estágio.

À Professora Doutora Maria Amélia Grácio, Professora Catedrática e Coordenadora do Mestrado em Ciências Biomédicas do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), desejo expressar o meu sincero reconhecimento por ter aceitado ser orientadora interna desta dissertação. Agradeço, também, a leitura e a revisão do presente trabalho bem como as sugestões feitas. Desejo, ainda, exprimir uma palavra de gratidão pela sua disponibilidade, simpatia e afabilidade.

Ao Engenheiro Orlando Marques, orientador do meu estágio profissional, gostaria de agradecer a flexibilidade de horários que me proporcionou, sem a qual não teria sido possível a concretização do presente trabalho. Obrigada pela preocupação e interesse demonstrados na boa viabilidade do trabalho experimental.

Por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus colegas e mais sinceros amigos, todo o incentivo e palavras de apoio presentes ao longo destes anos.

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 1: Microscopia electrónica de <i>S. aureus</i> usando a coloração de Gram (x1000).....	9
Fig. 2: Microscopia electrónica de <i>P. aeruginosa</i> usando a coloração de Gram.....	12
Fig. 3: Microscopia electrónica de <i>E. coli</i> usando a coloração de Gram.....	14
Fig. 4: Microscopia electrónica de <i>E. faecalis</i> usando a coloração de Gram.....	16
Fig. 5: Microscopia electrónica de <i>Salmonella</i> usando a coloração de Gram	20
Fig. 6: Microscopia electrónica de <i>L. monocytogenes</i> usando a coloração de Gram.....	23
Fig. 7: Bancada de trabalho no laboratório de microbiologia do INSA, I.P.....	54
Fig. 8: Culturas bacterianas de <i>S. aureus</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Salmonella</i> Typhimurium e <i>L. monocytogenes</i> em meio sólido TSA ou PFC-A.....	55
Fig. 9: Meio de cultura TSA.....	56
Fig. 10: Água por agulhas e alguns dos neutralizantes testados.....	56
Fig. 11: Banho termoestatizado a $20 \pm 1^\circ \text{C}$ onde se efectuaram os testes e banho termoestatizado a $45 \pm 1^\circ \text{C}$ para manter derretidos os meios de cultura.....	58
Fig. 12: Aparelho densimat (biomérieux) utilizado para medir a densidade de células bacterianas.....	58
Fig.13: Estufa mantida a 37°C para incubação.....	59
Fig. 14: Tubos contendo meio líquido BHI usados para o crescimento das bactérias.....	60
Fig. 15: Soluções contendo alguns dos desinfetantes testados.....	61
Fig. 16: Correlação entre as leituras do espectrofotómetro medidas a um comprimento de onda de 620 nm e as leituras do aparelho densimat (bioMérieux).....	69
Fig. 17: Representação gráfica do método de diluição-neutralização.....	123
Fig. 18: Representação gráfica dos controlos do método de diluição-neutralização.....	124

ÍNDICE DE TABELAS

Pág.

Tabela I: Diversas classes de biocidas usados em desinfectantes e respectivas estruturas químicas.....	35
Tabela II: Principais características dos desinfectantes	50
Tabela III: Esquema dos vários neutralizantes testados e respectiva composição química.....	57
Tabela IV: Desinfectantes testados, respectivos princípios químicos bactericidas e soluções teste preparadas.....	62
Tabela V – Número de células contadas, por mililitro, nas diferentes misturas teste.....	121

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

N , N_v , N_0 , N_{v0} , Na , B e C – representam o número de células contadas, por cada um mililitro, nas diferentes misturas teste, de acordo com a tabela IV dos Anexos.

B – Mistura controlo do neutralizante

C – Mistura controlo do método de validação

N – Suspensão bacteriana

Na – Mistura do teste bactericida

N_{v0} – Suspensão bacteriana de validação

R = Redução bacteriana

V_c = número de *cfu* por cada um mililitro de amostra. Todos os valores experimentais foram registados como valores V_c

$\bar{x}$ = Média dos valores de contagem V_{c1} e V_{c2}

$\bar{x}_{wm}$ = Média ponderada de $\bar{x}$

AgSD - Sulfadiazina de prata (*silver sulfadiazine*)

BAL – Bactérias ácido-lácticas

BHI – Meio de cultura (*Brain heart infusion*)

C – Citosina

CEN – Comité Europeu de Normalização

Cfu – Unidades formadoras de colónias (*colony-forming unit*)

Cfu/ml – Unidades formadoras de colónias, por mililitro.

CLC – Compostos libertadores de cloro

CMB – Concentração mínima bactericida

CMI – Concentração mínima inibitória

DCs – Células dendríticas

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*desoxiribonucleic nucleic acid*)

ECDC – Centro Europeu para a Prevenção e Controlo de Doenças (*European Centre for Disease Prevention and Control*)

EDTA - Ácido etilenodiamina tetra-acético (*ethylenediamine tetraacetic acid*)

EFSA – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (*European Food Safety Authority*)

EHEC – *Escherichia coli* entero-hemorrágica (*Enterohemorrhagic E. coli*)

FDA – *Food and Drug Administration*

G – Guanina

H₂O₂ - Peróxido de hidrogénio

HACCP – Análise de perigos e controlo dos pontos críticos (*Hazard Analysis and Critical Control Points*)

ISO – Organização Internacional de Normalização (*International Organization for Standardization*)

LPS – Lipopolissacárido

MLST – Tipagem de sequência multilocus (*multilocus sequence typing*)

M_r – Massa molecular relativa

NaCl – Cloreto de sódio

NaDCC - Dicloroisocianurato de sódio (*sodium dichloro isocyanurate*)

OMS – Organização Mundial de Saúde (WHO – *World Health Organization*)

OPA – O-ftalaldeído (*Ortho-phthalaldehyde*)

PAA – Ácido peracético (*peracetic acid*)

PCA – Meio de cultura (*plate count agar*)

PHMB - Biguanida de polihexametileno (*poly hexamethylene biguanide hydrochloride*)

QACs – Compostos quaternários de amónia (*Quaternary ammonium compounds*)

RNA - Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

rRNA – Ácido ribonucleico ribossómico (*ribosomal ribonucleic acid*)

SLT, STX ou VT - Toxina do tipo Shiga (*Shiga-like toxin*), toxina Shiga (*Shiga toxin*) ou verotoxina (*verotoxin*)

SNC – Sistema nervoso central

SOS – Stress oxidativo

ST – Sequência tipo (*Sequence type*)

STEC - Estirpes de *E.coli* produtoras da toxina Shiga (Shiga toxin-producing *E. coli*)

SUH – Síndrome urémica hemolítica

TA – Toxinfecções alimentares

tRNA – Ácido ribonucleico de transferência (*transfer ribonucleic acid*)

TSA – Meio de cultura de triptona agár (*Trypticase soya agar*)

UE – União Europeia

VTEC – Estirpes verotoxigénicas de *E. coli* (*verotoxin-producing E. coli*)

RESUMO

As bactérias patogénicas presentes nos sistemas de processamento de alimentos podem ser potencialmente causadoras de doenças alimentares graves, quando sobrevivem à acção bactericida de desinfectantes. Esta acção depende da eficácia das substâncias activas que fazem parte da formulação do desinfectante e das condições ambientais onde se processa a interacção desinfectante – bactéria, sendo ainda específica para cada estirpe bacteriana.

Este trabalho teve, como propósito, a implementação de um método que permita avaliar, *in vitro*, a eficácia bactericida de desinfectantes comerciais contra estirpes bacterianas que são potencialmente causadores de doenças de origem alimentar. A eficácia do desinfectante foi avaliada seguindo a Norma EN1040 e aplicando o método de diluição-neutralização. Para além das estirpes recomendadas naquele documento normativo, nomeadamente, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, foram também utilizadas *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella Typhimurium* e *Listeria monocytogenes*. Os desinfectantes foram seleccionados com base nas suas formulações, tendo sido escolhidos desinfectantes cujos princípios activos são, respectivamente: tensioactivos aniónicos; alcalis inorgânicos; hidrocloreto de biguanida polimérica; álcool etoxilado ou cloreto benzalcónio. Foram seleccionados como neutralizantes: tampão fosfato, tiosulfato de sódio, gema de ovo fresca e polisorbato 80 com histidina. Após cada ensaio, o número de bactérias sobreviventes foi obtido pelo cálculo da redução logarítmica decimal, a partir do número de unidades formadoras de colónia presentes em cada placa. A eficácia do desinfectante, na inactivação de cada estirpe alvo, foi classificada numa escala de redução logarítmica à qual 5 log corresponde a redução mínima aceitável do número de colónias quando o tempo de contacto é de 5 minutos, e a temperatura do ensaio é 20°C.

Conclui-se que o método de diluição-neutralização é sensível para todas as estirpes testadas. A gema de ovo fresca revelou ser o melhor neutralizante para desinfectantes contendo tensioactivos aniónicos, enquanto o tampão fosfato é mais adequado para neutralizar desinfectantes contendo alcalis inorgânicos. Porém, nenhum dos neutralizantes testados mostrou ser adequado para os desinfectantes contendo cloreto de benzalcónio ou hidrocloreto biguanida polimérica ou álcool etoxilado. Conclui-se também que as condições laboratoriais implementadas são as adequadas para testar a acção bactericida de desinfectantes utilizados em sistemas de processamento de alimentos.

Palavras-chave: Microbiologia alimentar, desinfectantes, eficácia bactericida, método de suspensão quantitativa.

ABSTRACT

Pathogenic bacteria present in food processing systems can potentially cause serious foodborne disease, when they survive to the bactericidal action of disinfectants. This action depends on the effectiveness of active substances that are part of the disinfectant formulation and on the environmental conditions where the interaction between the disinfectant and the bacteria takes place and are also specific for each bacterial strain.

The purpose of this work was the implementation of a methodology for assessing the bactericidal efficacy *in vitro* of commercial disinfectants against bacterial strains that can potentially cause foodborne diseases. The effectiveness of the disinfectants was evaluated according to European Normalization EN1040, using the dilution-neutralization method. In addition to the strains recommended in EN1040 namely *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*; the bacterial strains *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* were also tested. The disinfectants were selected based on their formulations so, was chosen disinfectants containing some of the following active ingredients: anionic surfactants, alkali inorganic, polymeric biguanide hydrochloride, benzalkonium chloride or alcohol ethoxylate. The selected neutralizers were: phosphate buffer, sodium thiosulfate, fresh egg yolk and polysorbate 80 with histidine. After each test, the number of surviving bacteria was obtained by calculation of the decimal logarithmic reduction from the number of colony forming units present in each plate. The inactivation effectiveness of the disinfectant on each bacterial strain was rated on a scale of logarithmic reduction which 5 log corresponds to the minimum reduction of the number of colonies acceptable, when the contact time is 5 minutes and the test temperature is 20 ° C.

It is concluded that the dilution-neutralization method is sensitive to all bacterial strains tested. Fresh egg yolk seems to be the best neutralizer for disinfectants containing anionic tensioactives, while phosphate buffer is more appropriate to neutralize disinfectants containing inorganic alkalis. However, none of the neutralizers tested seems to be adequate in neutralizing disinfectants containing benzalkonium chloride hydrochloride or polymeric biguanide or alcohol ethoxylate. We also conclude that these laboratory conditions are adequate to evaluate the bactericidal action of disinfectants used in food processing systems.

Keywords: Food microbiology, disinfectants, bactericidal efficacy, quantitative suspension method.

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos	i
Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	iv
Abreviaturas e Símbolos	v
Resumo	viii
<i>Abstract</i>	ix
I. Introdução	1
1. Alimentos	1
1.1 Os alimentos como veículos de doenças	1
1.1.1 Fontes de contaminação dos alimentos	1
1.1.2 Doenças de origem alimentar	2
1.1.2.1 Impacto na Saúde Pública	3
1.1.3 Toxinfecções alimentares	4
1.1.3.1 Infecções	4
1.1.3.2 Intoxicações	4
1.1.4 Surtos alimentares na Europa	5
1.2 Segurança alimentar microbiológica.....	5
1.2.1 HACCP	6
2. Bactérias	8
2.1 Bactérias alimentares patogénicas	8
2.1.1 <i>Staphylococcus</i>	9
2.1.1.1 Filogenia e taxonomia de <i>Staphylococcus</i>	10
2.1.1.2 Meios de transmissão de <i>S. aureus</i>	10
2.1.1.3 Patogénese e manifestações clínicas de <i>S. aureus</i>	10

2.1.2	<i>Pseudomonas</i>	12
2.1.2.1	Filogenia e taxonomia de <i>Pseudomonas</i>	12
2.1.2.2	Meios de transmissão de <i>Pseudomonas</i>	13
2.1.2.3	Patogénese e manifestações clínicas de <i>P. aeruginosa</i>	13
2.1.3	<i>Escherichia coli</i>	14
2.1.3.1	Filogenia e taxonomia de <i>E. coli</i>	15
2.1.3.2	Meios de transmissão de VTEC	15
2.1.3.3	Patogénese e manifestações clínicas de VTEC.....	15
2.1.4	<i>Enterococcus</i>	16
2.1.4.1	Filogenia e taxonomia de <i>Enterococcus</i>	17
2.1.4.2	Meios de transmissão de <i>E. faecalis</i>	18
2.1.4.3	Patogénese e manifestações clínicas de <i>E. faecalis</i>	19
2.1.5	<i>Salmonella</i>	20
2.1.5.1	Filogenia e taxonomia de <i>Salmonella</i>	21
2.1.5.2	Meios de transmissão de <i>S. Typhimurium</i>	22
2.1.5.3	Patogénese e manifestações clínicas de <i>S. Typhimurium</i>	22
2.1.6	<i>Listeria</i>	23
2.1.6.1	Filogenia e taxonomia de <i>Listeria</i>	24
2.1.6.2	Meios de transmissão de <i>L. monocytogenes</i>	25
2.1.6.3	Patogénese e manifestações clínicas de <i>L. monocytogenes</i>	25
2.2	Níveis de Organização das Bactérias	27
2.2.1	Biofilmes	28
2.3	Acumulação de bactérias em ambientes de processamento de alimentos....	29
3.	Programas de Higienização e Desinfecção.....	30
3.1	Processos de limpeza.....	30
3.2	Processos de desinfecção.....	31
4.	Desinfetantes.....	31
4.1	Importância dos desinfetantes na indústria alimentar	32
4.2	Grau de eficácia dos desinfetantes.....	33
4.3	Classes de biocidas usados em desinfetantes	34
4.3.1	Álcoois	36
4.3.1.1	Mecanismo molecular de acção dos álcoois.....	36
4.3.2	Aldeídos	36
4.3.2.1	Mecanismo molecular de acção dos aldeídos	37

4.3.3	Biguanidas	37
4.3.3.1	Mecanismo molecular de acção das biguanidas	37
4.3.4	Compostos Libertadores de Halogéneo	38
4.3.4.1	Mecanismo molecular de acção dos CLC	38
4.3.5	Compostos de Prata	39
4.3.5.1	Mecanismo molecular de acção dos compostos de prata ...	39
4.3.6	Peróxidos	39
4.3.6.1	Mecanismo molecular de acção dos peróxidos	40
4.3.7	Fenóis	40
4.3.7.1	Mecanismo molecular de acção dos fenóis	40
4.3.8	Halofenóis	40
4.3.8.1	Mecanismo molecular de acção dos halofenóis	41
4.3.9	Compostos Quaternários de Amónia (QACs).....	41
4.3.9.1	Mecanismo molecular de acção dos QACs	41
4.3.10	Novos desinfetantes	42
4.3.10.1	Mecanismo molecular de acção do OPA	42
4.4	Resistência bacteriana aos desinfetantes.....	43
4.4.1	Mecanismos de resistência inata.....	43
4.4.1.1	Mecanismos de resistência inata em Gram-positivas.....	43
4.4.1.2	Mecanismos de resistência inata em Gram-negativas.....	44
4.4.1.3	Adaptações fenotípicas	45
4.4.2	Mecanismos de resistência adquirida	47
4.4.2.1	Resistência adquirida por plasmídeos	48
4.4.2.1.1	Resistência adquirida por plasmídeos em Gram-negativas.....	48
4.4.2.2	Resistência adquirida por mutações	49
5.	Enquadramento Normativo	51
5.1	Legislação Mundial	51
5.2	Legislação Europeia	51
5.2.1	Métodos certificados para avaliar a actividade bactericida de desinfetantes químicos	52
5.2.2	Testes de suspensão quantitativa	52

II. Objectivos	53
III. Material e Métodos	54
IV. Resultados	69
V. Discussão	99
VI. Conclusões	113
VII. Referências Bibliográficas	116
VIII. ANEXOS	120

I. INTRODUÇÃO

1. Alimentos

Os alimentos possuem um papel essencial na saúde humana. Porém, os alimentos podem ser um meio de cultura ideal para o desenvolvimento microbiano. Apesar de os microrganismos poderem ser usados para transformar alimentos crus em especialidades gastronómicas (como os queijos, os pickles, o leite, os iogurtes, produtos de salsicharia, entre outros) ou para produzir bebidas alcoólicas (como a cerveja e o vinho), os alimentos também podem ser um veículo de transmissão de doenças (Pan, Breidt Jr., & Kathariou, 2006) (Ferreira & Sousa, 2000).

1.1 Os Alimentos como veículos de doenças

É difícil precisar quando começou o Homem a preocupar-se com a presença dos microrganismos nos alimentos. Pasteur pode ser considerado um marco nessa preocupação, quando em 1861 compreendeu e demonstrou o importante papel dos microrganismos na alteração dos alimentos (Ferreira & Sousa, 2000).

Actualmente sabe-se que existem diferentes géneros e espécies microbianas que se encontram habitualmente nos alimentos, cada uma com as suas exigências nutricionais próprias e afectadas pelo ambiente em que se desenvolvem.

1.1.1 Fontes de contaminação dos alimentos

As fontes de contaminação dos alimentos pelos microrganismos podem ser o solo, a água, o ar, as plantas, a pele dos animais, as rações animais, o tracto gastrointestinal, os manuseadores de alimentos e os utensílios presentes em sistemas de processamento de alimentos (Velázquez, Barbini, Escudero, Estrada, & Guzmán, 2009).

Existem diversos tipos de microrganismos susceptíveis de contaminar os alimentos, dando origem a diferentes doenças alimentares.

1.1.2 Doenças de origem alimentar

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define doença de origem alimentar como sendo uma doença provocada por agentes patogénicos que são transmitidos ao homem pela ingestão de água ou alimentos contaminados. Algumas doenças de origem alimentar são classificadas como zoonoses – doenças ou infecções que podem ser transmitidas dos animais para os humanos, através dos alimentos (EFSA, 2010)

As doenças de origem alimentar são um problema de saúde pública tanto para os países desenvolvidos como para os países em vias de desenvolvimento. Apesar de ser difícil estimar a incidência a nível mundial das doenças de origem alimentar, sabe-se que, só no ano de 2005, foram registadas 1,8 milhões de mortes causadas por doenças diarreicas. Grande parte dos casos é provocada pela ingestão de alimentos ou água contaminados (EFSA, 2010)

Nos países industrializados, a percentagem de população que sofre de doenças de origem alimentar, por ano, chega a ser superior a 30% (EFSA, 2010). O número real de casos de doenças de origem alimentar em Portugal é ainda desconhecido.

De acordo com o último relatório do Centro Europeu para a Prevenção e Controlo de Doenças (ECDC), a salmonelose foi a segunda doença zoonótica mais reportada em humanos, com 131 468 casos confirmados. Embora a salmonela seja detectada com mais frequência em carne de frango, peru e porco, também têm sido reportados casos de couves e especiarias com elevados níveis de contaminação por esta bactéria.

Foram confirmados 3 159 casos humanos de infecções causadas por *Escherichia coli* verotoxigénica (VTEC) na União Europeia, em 2008, sendo esta bactéria mais frequentemente encontrada em carne de vaca (EFSA, 2010)

Durante o ano de 2008 foram confirmados, na União Europeia, 1 381 casos de Listeriose. Apesar do número de casos ser relativamente baixo, as doenças alimentares provocadas por *Listeria* possuem uma taxa de mortalidade associada bastante elevada – 20,5% - nos casos notificados em

2008. As principais fontes de infecção por *Listeria* foram o pescado, os queijos, os produtos cárneos e as sandes (EFSA, 2010).

1.1.2.1 Impacto na Saúde Pública

As doenças provocadas pelo consumo de alimentos contaminados têm aumentado em todo o mundo, constituindo um dos mais importantes problemas de Saúde Pública a nível mundial. De acordo com a OMS, 1 em cada 3 habitantes dos países industrializados sofre, em cada ano, de doenças agudas transmitidas pelos alimentos. Este tipo de doença tem sido responsável por custos sociais e económicos elevados que se devem, essencialmente, ao absentismo escolar e laboral e aos custos de tratamento ou de hospitalização.

Para além disso, as doenças de origem alimentar são um importante problema de saúde pública devido ao aparecimento de novos agentes patogénicos, um pouco por todo o mundo. Muitos destes microrganismos patogénicos têm como reservatórios animais saudáveis, a partir dos quais contaminam uma grande variedade de alimentos. Tal resulta em milhões de casos anuais que podem ser esporádicos, originar complicações crónicas ou causar surtos alimentares graves (Cotterchio, Gunn, Torney, & Barry, 1998) (Gandhi & Chikindas, 2007).

Um surto alimentar é definido pelo aparecimento de pelo menos dois casos semelhantes, com sintomatologia geralmente gastrointestinal, sendo possível relacionar a causa com a mesma origem alimentar (Ferreira & Sousa, 2000). Geralmente as doenças de origem alimentar resultam em casos esporádicos que, muitas vezes, não são sequer reportados. O mesmo já não acontece com os surtos alimentares que, na maioria das vezes, alcançam grandes proporções e transformam-se num problema social e económico nas comunidades e nos sistemas de saúde.

Porém, raramente se conhece a real incidência destas situações, estimando-se que apenas 10% dos surtos são registados e os casos isolados quase ignorados (Ferreira & Sousa, 2000)

1.1.3 Toxinfecções alimentares

As toxinfecções alimentares podem ser provocadas pela mera presença de um microrganismo patogénico num alimento que vai colonizar o hospedeiro, após este ter ingerido o alimento contaminado. São as denominadas infecções alimentares.

Porém, as toxinfecções também podem resultar da ingestão de substâncias tóxicas (ou toxinas) sintetizadas pelo metabolismo de microrganismos durante a sua proliferação no alimento. Neste caso, as toxinfecções são denominadas intoxicações alimentares.

1.1.3.1 Infecções

As infecções alimentares ocorrem quando se ingere um alimento contaminado com um microrganismo patogénico que é capaz de crescer no tracto gastrointestinal. Após a ingestão, o patógeno multiplica-se e invade os tecidos, podendo ocorrer libertação de toxinas (Viegas, 2010).

Os sintomas aparecem após um período de incubação que pode durar umas horas, vários dias ou até semanas, pois é necessário tempo para que o microrganismo se multiplique e exerça a sua acção patogénica. Algumas das infecções de origem alimentar mais frequentes são a salmonelose, causada pela ingestão de *S. typhimurium* ou *S. enteritidis*; a listeriose, causada pela ingestão de *L. monocytogenes* e a diarreia e colite provocadas pela ingestão de *E.coli*.

1.1.3.2 Intoxicações

As toxinfecções alimentares (TA) são doenças provocadas pela ingestão de alimentos que contém a toxina produzida pelo microrganismo. As TA constituem um perigo para a saúde pública pelo aumento do número de casos com consequências graves. Embora o registo de episódios de TA seja inferior à realidade, sabe-se que têm consequências negativas quer do ponto de vista da saúde, quer económico.

A informação acerca das TA na União Europeia (UE) é reportada anualmente por vinte e quatro países, de acordo com a directiva 2003/99/EC. Desde 2007 foi implementado um novo sistema de notificação para TA, onde se faz distinção entre TA prováveis e verificadas. Os valores respeitantes às TA verificadas tem evidenciado uma forte ligação entre os casos humanos e a origem alimentar comum (Alonso-Hernando, Alonson-Calleja, & Capita, 2009).

De acordo o último relatório da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), foram notificadas em 2007 um total de 5 609 TA. Do total das TA, 36.1% correspondem a TA verificadas que afectaram 39 727 pessoas, resultando em 3 291 hospitalizações e 19 mortes.

1.1.4 Surtos alimentares na Europa

Na Europa, a prevalência de microrganismos patogénicos transmitidos pelos alimentos é bastante elevada, bem como o número de casos reportados e a ocorrência de surtos alimentares [34].

De acordo com o último relatório da EFSA e do ECDC, no ano de 2008, foram registados na Europa 5 332 surtos alimentares causadores de 45 622 casos em humanos, 6 230 hospitalizações e 32 mortes. A maioria destes surtos foi causada por salmonela (35,4%) e por toxinas bacterianas (9,8%). Em Portugal, no ano de 2008, registou-se uma incidência de 3,1 casos de salmonelose por 100.000 habitantes. Os alimentos causadores de surtos nos últimos anos foram: os ovos e derivados (23,1%), a carne de porco e derivados (10,2%) e as refeições mistas ou *buffet* (9,2%) (EFSA, 2010)

1.2 Segurança alimentar microbiológica

As boas práticas na preparação e manuseamento dos alimentos são especialmente importantes devido ao seu potencial para evitar a propagação de surtos causadores de doenças alimentares (Cotterchio, Gunn, Torney, & Barry, 1998) .

Porém, a constante mudança dos hábitos alimentares dos consumidores, com uma tendência actual para o consumo de alimentos pouco cozinhados, prontos a comer e produtos refrigerados ou

congelados tem afectado negativamente a incidência de doenças de origem alimentar nos últimos anos (Gandhi & Chikindas, 2007).

Assim, existem diversos factores que têm contribuído para a contaminação de alimentos por bactérias patogénicas, nomeadamente, as recentes modificações na produção e práticas de processamento de alimentos, a globalização da indústria alimentar e a crescente procura por alimentos importados (Gandhi & Chikindas, 2007).

A maioria dos casos notificados de doenças de origem alimentar é proveniente de estabelecimentos públicos como os restaurantes (Cotterchio, Gunn, Torney, & Barry, 1998), daí a importância das boas práticas na manipulação dos alimentos como meio para evitar a propagação de surtos. Porém, o facto de serem seguidas boas práticas de fabrico não determina, por si só, que os alimentos produzidos estejam isentos de microrganismos patogénicos. Para produzir alimentos seguros que não ponham em risco a saúde do consumidor, é necessário implementar sistemas de controlo eficazes, ao longo de toda a cadeia de fabrico e distribuição.

O *Codex Alimentarius* (expressão em latim que significa "código alimentar") é um conjunto de padrões reconhecidos internacionalmente, códigos de conduta, orientações e outras recomendações relativas a alimentos, produção de alimentos e segurança alimentar. De acordo com o *Codex Alimentarius*, alimentos seguros são aqueles que “quando são preparados e ingeridos de acordo com as condições normais de utilização, não prejudicam a saúde do consumidor”.

Quando ocorrem toxinfecções alimentares, estas devem-se a desvios ou incidentes que não foram detectados a tempo. Como tal, se conhecermos as causas das toxinfecções, podemos preveni-las. E é esse o princípio do sistema de análise dos perigos e pontos críticos de controlo – *Hazard Analysis Critical Control Point* (HACCP).

1.2.1 HACCP

O HACCP é um sistema preventivo que busca a produção de alimentos inócuos. O seu objectivo é a prevenção e não a inspecção do produto terminado. Assim, para além de garantir a elaboração

do alimento de maneira segura o HACCP permite comprovar, através de documentação técnica apropriada, que o produto foi elaborado com segurança.

Os princípios do HACCP são aplicáveis a todas as fases da produção de alimentos, incluindo a agricultura básica, a pecuária, a industrialização e manipulação dos alimentos, os serviços de alimentação colectiva, os sistemas de distribuição e manuseamento e a utilização do alimento pelo consumidor.

De acordo com o *National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods*, os sete princípios estabelecidos pelo HACCP são:

1º - Efectuar uma análise dos perigos e criar um fluxograma com todas as etapas do processo. Identificar e listar perigos potenciais e especificar medidas preventivas para o seu controlo.

2º - Identificar os pontos críticos de controlo.

3º - Estabelecer os limites críticos que devem ser respeitados para garantir que cada ponto crítico de controlo está sob controlo.

4º - Estabelecer um sistema de vigilância de controlo dos pontos críticos de controlo através de observações e/ou testes periódicos programados.

5º - Determinar as acções correctivas a serem tomadas quando o sistema está fora de controlo.

6º - Organizar a documentação respeitante a todos os procedimentos e registos relativos a estes princípios e sua aplicação.

7º - Criar procedimentos de verificação que incluam ensaios suplementares apropriados e procedimentos que, em conjunto com uma revisão do plano HACCP, confirmem que tudo está a funcionar eficazmente.

Em suma, o HACCP pode ser usado para controlar qualquer área ou ponto do sistema alimentar que levar a uma situação de risco devida à contaminação microbiológica, química ou física, quer durante o processo de fabrico, quer ao nível das matérias-primas, quer às condições de armazenagem.

Bactérias

As doenças bacterianas de origem alimentar podem ser produzidas por três tipos de bactérias: bactérias toxigénicas, bactérias patogénicas e bactérias saprófitas.

As bactérias toxigénicas formam toxinas no alimento durante a sua multiplicação, cuja ingestão provoca no consumidor um quadro patológico que está relacionado apenas com a toxina e não com as células bacterianas. É o que acontece quando a toxina da bactéria *Staphylococcus aureus* é ingerida, provocando intoxicações alimentares.

As bactérias patogénicas contaminam o alimento ingerido, multiplicando-se activamente no aparelho digestivo e provocando uma reacção do tipo infeccioso. Os sintomas de doença só aparecem se, no alimento, existirem células viáveis dessas bactérias. É o caso da bactéria *Salmonella* que, quando está presente no alimento, pode causar infecções alimentares.

Existem também bactérias que são habitualmente saprófitas, porém, a sua multiplicação anormal nos alimentos pode provocar reacções no consumidor, idênticas às causadas por bactérias patogénicas. Um bom exemplo são as bactérias pertencentes ao género *Enterococcus*.

2.1 Bactérias alimentares patogénicas

As bactérias alimentares patogénicas relevantes para o presente trabalho são: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Enterococcus faecalis* e *Listeria monocytogenes*. Como tal, serão apresentadas de seguida a filogenia, taxonomia, meios de transmissão, patogénese e manifestações clínicas, para cada uma das bactérias referidas.

2.1.1 *Staphylococcus*

As bactérias pertencentes ao género *Staphylococcus* caracterizam-se por serem cocos Gram-positivos com um diâmetro de 0,5 a 1,5 µm, imóveis, capsulados e não esporulados (fig. 1).

Agrupam-se caracteristicamente em cacho, porém, também se podem observar de outras formas, nomeadamente, cocos isolados, aos pares ou em cadeias curtas. São anaeróbios facultativos e capazes de crescer em meios com elevado teor de cloreto de sódio (10%) e a temperaturas compreendidas entre 18° e 40°C.

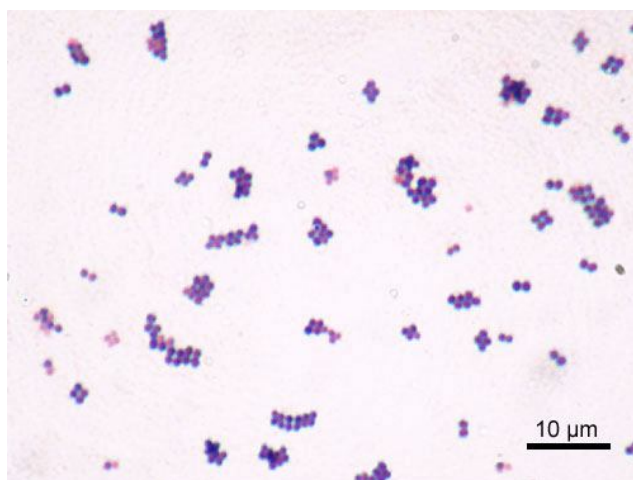


Fig. 1: Microscopia electrónica de *S. aureus* usando a coloração de Gram (x1000).

Os estafilococos são fáceis de cultivar *in vitro* pois são nutritivamente pouco exigentes e, portanto, desenvolvem-se bem na maioria dos meios de cultura usados nos laboratórios de microbiologia. Necessitam de 24 horas de incubação a 37°C para formarem colónias redondas, de 2 a 3 mm de diâmetro, brilhantes, lisas e opacas. A cor das colónias pode variar de branco a amarelo dourado ou alaranjado. Das espécies patogénicas para o Homem, somente *S. aureus* produz a enzima coagulase e, como tal, as restantes espécies de estafilococos são designadas coagulase-negativa (Ferreira & Sousa, 2000)

A parede celular dos estafilococos é a componente estrutural mais importante. É limitada no interior pela membrana citoplasmática e no exterior pela cápsula e é constituída por peptidoglicano, proteína A e ácidos teicóicos.

2.1.1.1 Filogenia e taxonomia de *Staphylococcus*

As bactérias do género *Staphylococcus* pertencem à família das *Micrococcaceae* e vivem normalmente numa relação de comensalismo ou mutualismo com o homem.

O nome *Staphylococcus* foi usado pela primeira vez por Ogston em 1883 e, desde então, a sua taxonomia tem sofrido muitas alterações. A classificação actual tem por base a caracterização fenotípica do microrganismo e o estudo genético, principalmente das relações de homologia do DNA.

Actualmente estão já descritas 30 espécies de *Staphylococcus* mas, do ponto de vista clínico, apenas duas são agentes patogénicos primários (*S. aureus* e *S. saprophyticus*) enquanto outras são responsáveis por infecções oportunistas (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. schleiferi* e *S. lugdunensis*).

2.1.1.2 Meios de transmissão de *S. aureus*

A origem da infecção é, na maioria das vezes, endógena, uma vez que cerca de 20 a 40% da população normal é portadora nasal de *S. aureus*, podendo este valor atingir os 60% no pessoal hospitalar. Porém, a transmissão também pode ser feita homem a homem por contacto directo, por via aérea ou por contacto indirecto (como é o caso do manuseamento de alimentos).

2.1.1.3 Patogénese e manifestações clínicas de *S. aureus*

As estirpes de *S. aureus* são dos agentes patogénicos que mais infecções causam, tanto na comunidade, como no hospital. A versatilidade e gravidade das infecções causadas por *S. aureus* devem-se a um conjunto de toxinas e enzimas produzidas por este microrganismo. As principais toxinas incluem quatro hemolisinas (α , β , γ e δ) com acção hemolítica, leucocida, letal e dermonecrótica; uma leucocidina com acção lítica para leucócitos; exfoliatinas (A e B) e enterotoxinas (A, B, C, D, E, G e H) termoestáveis, responsáveis por casos de intoxicações alimentares (Le Loir, Baron, & Gautier, 2003).

As enzimas mais importantes são: a coagulase, capaz de provocar a coagulação do plasma conduzindo ao depósito de fibrina em redor dos estafilococos e protegendo-os da fagocitose; a hialuronidase, com acção sobre o ácido hialurónico, a fibrinolisinase ou estafiloquinase que activa o plasminogénio e possui uma potente acção fibrinolítica; lipases que hidrolisam lípidos e parecem ser necessárias para a invasão da pele e tecido celular subcutâneo; a catalase, responsável pela conversão do peróxido de hidrogénio em oxigénio e água, protegendo o microrganismo dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogénio formado, e a desoxiribonuclease que destrói o DNA mas cuja intervenção na patogénese da infecção é ainda desconhecida (Ferreira & Sousa, 2000).

As doenças causadas por *S. aureus* podem resultar da invasão e lesão dos tecidos pelo microrganismo ou resultar da acção das suas toxinas. As toxinas produzidas por *S. aureus* podem dar origem a três quadros clínicos distintos: intoxicação alimentar estafilocócica, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico (Le Loir, Baron, & Gautier, 2003).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das mais frequentes intoxicações alimentares de origem microbiana, provocada pela ingestão de uma das sete enterotoxinas estafilocócicas serologicamente distintas (A, B, C, D, E, G e H), das quais a enterotoxina A parece ser a mais prejudicial.

Os sintomas que advém de uma intoxicação alimentar estafilocócica são vômitos intensos, diarreia e dores abdominais que surgem cerca de 4 horas após a ingestão do alimento contaminado e cessam, geralmente, nas primeiras 24 horas.

2.1.2 *Pseudomonas*

As bactérias pertencentes ao género *Pseudomonas* são bactérias Gram-negativas em forma de bastonete direito ou ligeiramente curvo com 0,5-1,0 µm por 1,5-4,0 µm (fig. 2). Possuem flagelos polares (simples ou múltiplos) e um metabolismo respiratório não fermentativo. Não formam endósporos e utilizam compostos orgânicos não poliméricos. Algumas são quimiolitotróficas e usam nitrato como receptor de electrões em anaerobiose, enquanto outras utilizam anaerobicamente a arginina (Ferreira & Sousa, 2000).



Fig. 2: Microscopia electrónica de *P. aeruginosa* usando a coloração de Gram.

2.1.2.1 Filogenia e taxonomia de *Pseudomonas*

Nas últimas décadas, graças às técnicas de biologia molecular que permitem agrupar espécies, taxonomicamente, com base na sua proximidade genética, as diversas espécies de *Pseudomonas* foram incluídas em cinco grupos distintos (I, II, III, IV e V), com base na homologia do rRNA (Mesaros, et al., 2007).

O grupo I é o característico do género e inclui espécies pigmentadas e não pigmentadas. As espécies pigmentadas, também denominadas pseudomonas fluorescentes, produzem um pigmento aquasolúvel que é fluorescente sobre radiação ultravioleta. *P. aeruginosa* faz parte do grupo I.

2.1.2.2 Meios de transmissão de *Pseudomonas*

P. aeruginosa possui uma distribuição mundial e encontra-se, habitualmente, na água ou no solo. A maioria das infecções provocadas por *Pseudomonas* ocorre por transmissão directa, através do contacto directo ou por auto-infecção. Os objectos inanimados como as superfícies que estão em contacto com alimentos podem servir como reservatórios ou vectores para *Pseudomonas* (Mesaros, et al., 2007).

2.1.2.3 Patogénese e manifestações clínicas *P. aeruginosa*

P. aeruginosa é um dos maiores agentes patogénicos causadores de doenças nosocomiais. A maioria das estirpes que provoca infecção é invasiva e toxigénica porque produz factores virulentos de superfície que lhe permite aderir, colonizar e invadir os tecidos. Para além, disso, *P. aeruginosa* produz também factores virulentos que secreta para danificar os tecidos ou promover a produção de citocinas (Yetkin, Otlu, Cicek, Kuzucu, & Durmaz, 2006).

Raramente *P. aeruginosa* infecta tecidos saudáveis, porém, quando as defesas do indivíduo estão comprometidas, a bactéria pode infectar (virtualmente) todos os tecidos, o que explica o porquê da maior parte das infecções causadas por *P. aeruginosa* serem nosocomiais.

As principais manifestações clínicas decorrentes da infecção por *P. aeruginosa* são infecções respiratórias, bacteremia e endocardite (Ferreira & Sousa, 2000).

2.1.3 *Escherichia coli*

E. coli assume a forma de um bacilo e pertence à família das *Enterobacteriaceae*. São bactérias Gram-negativas (fig. 3), aeróbias e anaeróbias facultativas. O seu habitat natural é o lúmen intestinal dos seres humanos e de outros animais de sangue quente. Apesar de *E. coli* ser uma bactéria comum da flora intestinal, existem estirpes que podem causar doença como, por exemplo, as estirpes de *E. coli* produtoras de verotoxinas (VTEC) (Callaway, et al., 2004).

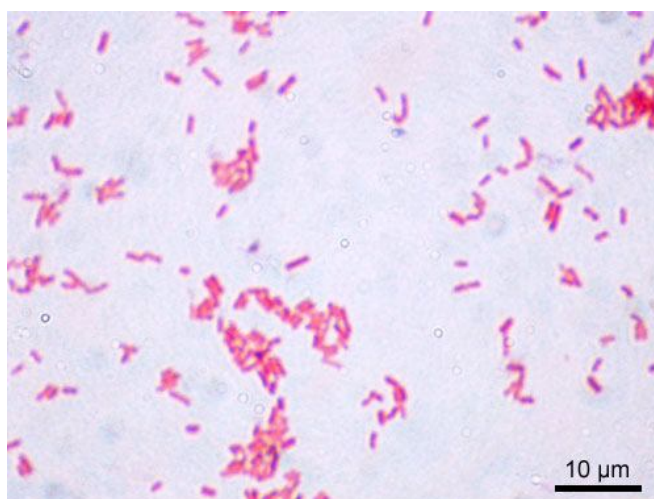


Fig. 3: Microscopia electrónica de *E. coli* usando a coloração de Gram.

VTEC tornou-se um sério problema público devido à sua associação com grandes surtos de síndrome urémica hemolítica (SUH), que é a principal causa de falha renal aguda nas crianças. Apesar de as crianças serem a faixa etária mais afectada, os idosos também são um factor de risco (Karmali, Gannon, & Sargeant, 2010).

E.coli O157:H7 foi identificado pela primeira vez como patógeno causador de doença em 1982, quando foi isolado a partir de carne mal cozinhada, devido à ocorrência de dois surtos de colite hemorrágica provenientes de uma cadeia de *fast food* (Karmali, Gannon, & Sargeant, 2010) (Callaway, et al., 2004).

2.1.3.1 Filogenia e taxonomia de *E. coli*

Actualmente já foram isolados mais de 380 serotipos diferentes de VTEC OH em humanos com doenças gastrointestinais. Apesar da frequência dos serotipos variar consoante o país e o ano, somente cerca de oito serotipos estão associados à maioria das doenças em humanos. De todos os serotipos enterohemorrágicos de *E. coli*, o O157:H7 é o que surge com mais frequência, tanto em surtos alimentares como em casos esporádicos graves (Karmali, Gannon, & Sargeant, 2010).

2.1.3.2 Meios de transmissão de VTEC

Os ruminantes domésticos são o principal reservatório de VTEC. A infecção por VTEC é normalmente adquirida pela ingestão de alimentos ou água contaminados. O gado bovino é o principal reservatório de estirpes VTEC associado a doença humana, sendo os rissóis de carne de vaca mal cozinhados e o leite não pasteurizado, as principais fontes de infecção (Karmali, Gannon, & Sargeant, 2010).

Os casos esporádicos ocorrem com mais frequência do que os surtos, sendo este número maior nos meses de verão, talvez devido ao aumento do consumo de hambúrgueres em churrascos.

2.1.3.3 Patogénese e manifestações clínicas de VTEC

VTEC são agentes zoonóticos que causam doença potencialmente fatal em humanos e cujo quadro clínico inclui diarreia, colite hemorrágica e SUH (Karmali, Gannon, & Sargeant, 2010).

A patogenicidade de *E.coli* O157:H7 deve-se à existência de bacteriófagos que codificam toxinas do tipo Shiga e que são tóxicas para células Vero (também denominadas verotóxicas) (Callaway, et al., 2004).

Existem duas classes principais de toxinas do tipo Shiga (toxinas Shiga ou verotoxinas): SLT1 (Stx1, VT1) e SLT2 (Stx2, Vt2). A produção de toxinas parece resultar da lise de um ou mais fagos conversores de toxinas. As toxinas possuem uma unidade A e cinco unidades B. SLT1 e

SLT2 ligam-se ao receptor de membrana Gb3. Consequentemente, a subunidade A é internalizada e clivada, bloqueando a síntese proteica por interferência com o tRNA e impedindo o transporte dos aminoácidos para o ribossoma (Callaway, et al., 2004).

Desta forma, as estirpes VTEC são normalmente divididas em *E.coli* O157 e *E.coli* não-O157. O termo *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) tem sido aplicado aos serotipos VTEC que possuem o mesmo quadro clínico e características epidemiológicas e patogénicas que *E.coli* O157:H7.

2.1.4 *Enterococcus*

Os membros do género *Enterococcus* são bactérias Gram-positivas (fig. 4) não formadoras de esporos que formam duplas de cocos ou cadeias pequenas, são catalase-negativa e anaeróbios facultativos (Mohamed & Huang, 2007) (Fisher & Phillips, 2009).

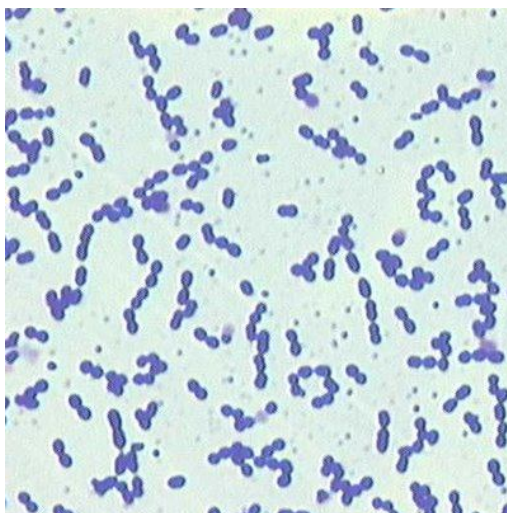


Fig. 4: Microscopia electrónica de *E. faecalis* usando a coloração de Gram.

Os enterococos típicos (como é o caso de *E. faecalis*) podem ser facilmente distinguidos de outros cocos Gram-positivos, catalase-negativa, homofermentativos (como os estreptococos e lactococos), pela sua capacidade de crescer a 10-45°C, em elevado teor de sal (6,5% NaCl), na presença de 40% de bÍlis e a pH alcalino (9.6) (Mohamed & Huang, 2007).

Os enterococos são bactérias ácido-láticas (BAL), com uma grande importância ambiental, alimentar e microbiológica clínica. Apesar de estas bactérias possuírem um papel importante na produção de diversos alimentos tradicionais fermentados e de probióticos na Europa, os enterococos também podem ser prejudiciais e estão associados à deterioração dos alimentos, principalmente de carne (Franz, Stiles, Schleifer, & Holzapfel, 2003).

Actualmente, *E.faecalis* é encontrado com mais frequência em alimentos e fezes de animais do que *E. faecium*, ao contrário do que acontecia (Klein, 2003). No intestino humano, *E. faecium* e *E. faecalis* são as espécies mais comuns.

Diversas estirpes do género *Enterococcus* são causadoras de doença, sendo *E. faecalis* responsável por 80-90% das infecções humanas enterocócicas (Mohamed & Huang, 2007).

2.1.4.1 Filogenia e taxonomia de *Enterococcus*

Em 1980, baseado em técnicas de classificação moleculares e estudos serológicos, os enterococos foram removidos do género *Streptococcus* (grupo D de Lancefield) e colocados num novo género: *Enterococcus*. Tendo como base a análise comparativa da sequência 16S do rRNA, o género *Enterococcus* pertence ao grupo das bactérias Gram-positivas cujo DNA possui baixo teor (%) em G+C (< 50 mol%) (Mohamed & Huang, 2007) (Klein, 2003).

Actualmente conhecem-se mais de 28 espécies de *Enterococcus*, das quais *E. faecium* e *E. faecalis* são as que desempenham um papel mais importante nas doenças humanas causadas por enterococos (Fisher & Phillips, 2009).

2.1.4.2 Meios de transmissão de *E. faecalis*

Os enterococcus estão presentes dispersamente pelo ambiente, devido à sua capacidade para crescer em condições adversas. Podem ser encontrados com alguma frequência no solo, nos alimentos, na água e numa diversidade de animais. Em humanos, fazem parte da flora intestinal normal (Mohamed & Huang, 2007).

Os enterococos são usados nos processos de fermentação de alimentos, na melhoria da qualidade sensorial de alguns alimentos e ainda como probióticos em diversos alimentos e rações (Klein, 2003). Porém, nos últimos 20 anos, os enterococos têm sido identificados com alguma frequência como agentes infecciosos em pacientes hospitalizados. Como tal, são consideradas bactérias oportunistas e encontram-se habitualmente na cavidade oral, microflora do intestino e tracto genital feminino de humanos e animais (Kayer, 2003).

Enterococcus nos alimentos

Os esterococos estão associados a determinados queijos tradicionais Europeus confeccionados em países mediterrânicos, a partir de leite cru ou pasteurizado.

Pensa-se que a fonte de contaminação dos enterococos no leite ou no queijo sejam as fezes das vacas leiteiras, água contaminada ou equipamento usado nas leitarias e/ou tanques de armazenamento de leite contaminados (Mohamed & Huang, 2007).

E. faecalis é a espécie de *Enterococcus* mais comum nas fezes de humanos, existindo em quantidades de 10^5 - 10^7 /g de fezes; sendo também a espécie mais comum encontrada no tracto intestinal de gado leiteiro. Esta espécie também já foi isolada de tanques de armazenamento de leite e equipamento utilizado em leitarias, concluindo-se que *E. faecalis* (e outras espécies de enterococos) possui a capacidade de se estabelecer no equipamento usado nas leitarias, levando à contaminação do leite e do queijo (Mohamed & Huang, 2007).

Os enterococos produzem uma variedade de bacteriocinas, que são toxinas proteicas que inibem o crescimento de estirpes bacterianas filogeneticamente próximas. A AS-48 é um desses exemplos. AS-48 é uma bacteriocina cíclica de elevado espectro, codificado por um plasmídeo e já foi isolada de leite cru e de laticínios (Fisher & Phillips, 2009).

A presença de enterococos no tracto intestinal de animais aumenta o potencial de contaminação da carne no momento do abate do animal. Um estudo efectuado com carcaças de porco originárias de três locais de abate diferentes revelou uma média de contagem de 10^4 - 10^8 enterococos/cm² de carne. *E. faecalis* foi uma das espécies isolada com mais frequência.

Dos cocos Gram-positivos, *E. faecalis* é a espécie mais frequentemente isolada de amostras de galinhas recolhidas de matadouros de aves. Os enterococos não contaminam apenas a carne crua; estas bactérias estão também associadas ao processamento da carne. O aquecimento da carne processada durante a produção pode conferir vantagem selectiva para *Enterococcus*, uma vez que estas bactérias são as mais termotolerantes de todas as bactérias não-esporuladas (Mohamed & Huang, 2007).

Os enterococos também já foram isolados de alguns tipos de salsichas fermentadas como salami, landjager e chouriço.

2.1.4.3 Patogénese e manifestações clínicas de *E. faecalis*

Os enterococos são dos patogénicos nosocomiais mais comuns, infectando normalmente pacientes com doenças graves ou imunocomprometidos. Podem causar bacteremia, endocardite, infecções urinárias e outros tipos de infecções (Mohamed & Huang, 2007).

E. faecalis é a espécie do género *Enterococcus* mais frequentemente isolada de humanos infectados (mais de 80%) (Klein, 2003).

Os enterococos ambientais ou alimentares conseguem sobreviver e, pelo menos transitoriamente, estabelecerem-se no tracto gastrointestinal humano.

Os enterococos têm vindo a tornar-se um dos patogénicos nosocomiais mais comuns, havendo casos de pacientes com um índice de mortalidade muito elevado, superior a 61% (Fisher & Phillips, 2009). Em 2005 foram reportados 7 066 casos de bacterémia causada por espécies de *Enterococcus*, no Reino Unido, o que representa um aumento de 8% em relação ao ano de 2004.

Os biofilmes de *E. faecalis* são extremamente difíceis de erradicar e são uma fonte de muitas infecções crónicas (Mohamed & Huang, 2007).

2.1.5 *Salmonella*

As bactérias pertencentes ao género *Salmonella* são Gram-negativas em forma de bacilo (fig. 5), anaeróbias facultativas, na sua maioria móveis, não esporuladas e não capsuladas. Pertencem à grande família das Enterobacteriaceae e a maioria não fermenta a lactose (Ferreira & Sousa, 2000).

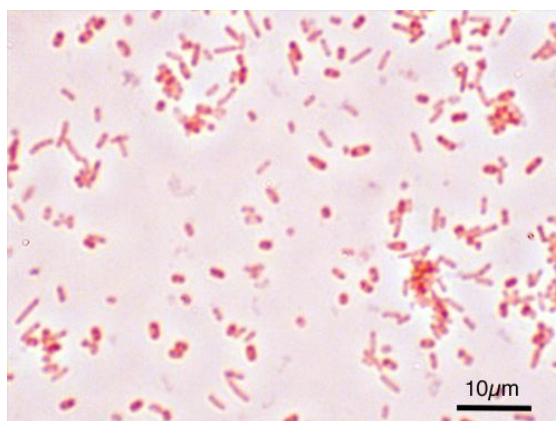


Fig. 5: Microscopia electrónica de *Salmonella* usando a coloração de Gram.

O género *Salmonella* é extremamente heterogéneo e contém três espécies: *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori* e *Salmonella subterranea*.

Algumas fazem parte da microflora normal do intestino de vertebrados, enquanto outras estão associadas a doença em humanos. Dentre as de maior importância para a saúde humana destacam-se *Salmonella* Typhi (*Salmonella enterica* serovar Typhi) que causa febre tifóide e a *Salmonella* Typhimurium (*Salmonella enterica* serovar Typhimurium), um dos agentes causadores de gastroenterites, a salmonelose. A salmonelose é a infecção bacteriana alimentar mais comum em todo o mundo (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009) (Lahiri, Das, & Chakravortty, 2009).

2.1.5.1 Filogenia e taxonomia de *Salmonella*

Salmonella está classificada em sete subespécies (I, II, IIIa, IIIb, IV, V e VI) com base em técnicas de hibridação de DNA e estudos de biotipagem (Lahiri, Das, & Chakravortty, 2009).

Para além disso, *Salmonella* também é classificada pelo antisoro de dois antígenos de superfície altamente variáveis: o antígeno O e o antígeno H. O antígeno O reflecte a variação numa das regiões expostas do lipopolissacárido e permite classificar *Salmonella* em serogrupos, enquanto o antígeno H reflecte a variação na flagelina (a proteína que existe em maior quantidade no flagelo) e permite classificar *Salmonella* em serótipos. Actualmente conhecem-se cerca de 46 serogrupos e 114 serótipos de *Salmonella* (Lan, P., & Octavia, 2009). 9% dos casos de salmonelose são causados por serovars da subespécie I, onde apenas 12 dos mais de 2000 serovars são responsáveis por 70% dos casos (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009).

Os serovars isolados com mais frequência são diferentes de região para região. Porém, os serovars Typhimurium, Enteritidis e Typhi são os responsáveis pela maioria dos casos de salmonelose que ocorre em humanos (Lahiri, Das, & Chakravortty, 2009).

Durante muitos anos, *Salmonella* Typhimurium era o serovar que se isolava com maior frequência porém, nos últimos anos, o serovar Enteritidis ultrapassou o número de casos de Typhimurium na União Europeia e em muitas outras áreas (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009).

Typhimurium é um patógeno humano causador de salmonelose em todo o mundo e é geneticamente diferente dos outros serovars da mesma subespécie. Os 46 isolados Typhimurium publicados na base de dados MLST de *Salmonella* estão agrupados em 12 STs (sequence type). O único alelo que diferencia as diversas variantes possui mutações em apenas uma base (em seis casos) ou em duas a cinco bases (dois casos). Isto faz com que a taxa de mutação por recombinação seja bastante elevada (3 para 1) o que explica, em parte, a enorme diversidade de Typhimurium. (Lan, P., & Octavia, 2009).

2.1.5.2 Meios de transmissão de *S. Typhimurium*

A salmonela é muitas vezes isolada do tracto gastrointestinal de animais como os pássaros, répteis, e vertebrados de sangue quente (gado e humanos) (Lahiri, Das, & Chakravortty, 2009).

Salmonella causa toxinfecções alimentares quando passa para a cadeia alimentar a partir dos animais domésticos. Como resultado, os humanos podem ser acidentalmente infectados, contraindo uma enterocolite de curta duração (Lan, P., & Octavia, 2009). A infecção ocorre, portanto, pela via oral-fecal.

A salmonela consegue sobreviver e crescer numa gama alargada de produtos. Os surtos têm sido frequentemente associados ao consumo de melão, couve, tomate, manga e pimenta contaminados (Lahiri, Das, & Chakravortty, 2009).

Porém, os surtos de salmonelose podem ter diversas origens, sendo a contaminação dos produtos no início da cadeia de produção alimentar uma origem comum. Principalmente a contaminação por parte das pessoas que preparam os alimentos ou o ambiente onde estes são manipulados (Lahiri, Das, & Chakravortty, 2009).

2.1.5.3 Patogénese e manifestações clínicas de *S. Typhimurium*

As duas espécies do género *Salmonella* possuem capacidade para invadir as células do hospedeiro devido à presença de SPI1 (Ilha de patogenicidade de *Salmonella*), mas apenas *S. enterica* possui a capacidade de se espalhar sistemicamente, devido à presença de SPI2 (Lan, P., & Octavia, 2009).

A salmonela também pode causar infecções persistentes. Assim, após colonizar o intestino, a salmonela invade os enterócitos, células M e células dendríticas (DCs) no epitélio intestinal. Ao alcançar a submucosa é fagocitada pelos macrófagos e consegue disseminar-se rapidamente pela corrente sanguínea, acumulando-se nos nódulos linfáticos mesotéricos e atingindo, por último, o baço (Ibarra & Steele-Mortimer, 2009) (Lahiri, Das, & Chakravortty, 2009).

Listeria

As bactérias pertencentes ao género *Listeria* são Gram-positivas (fig. 6), anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos e encontram-se amplamente distribuídas pela natureza. *Listeria* consegue resistir a condições ambientais adversas, nomeadamente stress ácido, anaerobiose, stress oxidativo, ausência de nutrientes, temperaturas entre os 0 e os 45°C e pH entre 4.1 a 9.6. Isto permite-lhe sobreviver no interior ou à superfície dos alimentos durante longos períodos de tempo (Drevets & Bronze, 2008).



Fig. 6: Microscopia electrónica de *L. monocytogenes* usando a coloração de Gram.

L. monocytogenes é um patogénico intracelular capaz de invadir, sobreviver e crescer nas células do tracto intestinal ou nos macrófagos do hospedeiro (Allerberger & M., 2010).

O primeiro surto de listeriose humana, directamente relacionada com o consumo de alimentos contaminados, foi reportado pela primeira vez em 1983 (Cossart, 2007). Actualmente a listeriose humana é uma doença rara e a sua prevalência está a baixar nos países industrializados devido ao aumento da implementação de medidas de controlo alimentar. Porém, nos últimos anos, a taxa de listeriose tem aumentado em diversos países Europeus e esta incidência não está relacionada com nenhum destes factores: geografia, género/sexo, etnicidade, factores sócio-económicos ou serotipos infecciosos (Lungu, Ricke, & Johnson, 2009).

No ano de 2007 foram reportados 1 554 casos confirmados de listeriose nos 26 países-membros na U.E., o que dá uma taxa de notificação de 0.3 por cada 100 000 pessoas [ECDC] (Allerberger & M., 2010). Ao contrário de outras bactérias alimentares normalmente associadas a uma elevada incidência mas baixa morbilidade, *L. monocytogenes* é uma bactéria que raramente causa doença. Porém, a listeriose é potencialmente grave e está associada a uma taxa de mortalidade muito elevada (superior a 30%) mesmo quando é diagnosticado ao doente um tratamento antimicrobiano adequado (Lecuit, 2007) (Drevets & Bronze, 2008). Para além disso, a listeriose continua a ser uma doença mal diagnosticada (principalmente na fase inicial da doença), fazendo com que haja um atraso na administração da terapia antimicrobiana, o que é essencial para que a recuperação do doente, mais uma vez contrastando com a maioria das infecções alimentares (Lecuit, 2007).

Na Europa, cerca de 10-20% dos casos clínicos estão associados à gravidez (incluindo recém-nascidos até às 4 semanas de idade), porém, a maioria dos casos ocorre em indivíduos imunocomprometidos (não-grávidas), principalmente em idosos (Allerberger & M., 2010) (Drevets & Bronze, 2008).

O CDC revelou que 11% das amostras alimentares recolhidas durante os programas de monitorização alimentar estavam contaminadas com *L. monocytogenes* (Lecuit, 2007). Isto fez com que a FDA e o Centro de Segurança Alimentar implementassem uma política de tolerância-zero no que respeita à contaminação de alimentos prontos-a-comer com *Listeria*. Desde 1996, esta política de tolerância-zero permitiu a redução de 24% da incidência de listeriose invasiva e 37% da listeriose em grávidas (Drevets & Bronze, 2008).

2.1.5.4 Filogenia e taxonomia de *Listeria*

Existem seis espécies pertencentes ao género *Listeria* mas apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são patogénicas. *L. monocytogenes* caracteriza-se por possuir um DNA com baixo teor em CG (38%) e ser filogeneticamente próxima de *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus* (Cossart, 2007).

Os serotipos de *L. monocytogenes* mais frequentemente isolados são o 4b, 1/2a e 1/2b (Drevets & Bronze, 2008).

2.1.5.5 Meios de transmissão de *L. monocytogenes*

Os humanos são infectados por *L. monocytogenes* através da ingestão de alimentos contaminados (Allerberger & M., 2010).

L. monocytogenes pode existir numa variedade de alimentos crus como carne e vegetais mal cozinhados ou alimentos que ficam contaminados durante o seu processamento, como os queijos frescos e a charcutaria que estão armazenados nos balcões refrigerados. O leite não pasteurizado e seus derivados também podem conter a bactéria (Lecuit, 2007).

Os produtos mais frequentemente infectados com *L. monocytogenes* têm sido os produtos lácteos (queijos, leite cru), agrícolas (morangos, saladas de fruta, cogumelos laminados) e outros alimentos pronto-a-comer como chucrute, miolo de caranguejo, salmão e peru fumado, salada de ovo, salada de batata e salada de macarrão (Drevets & Bronze, 2008).

L. monocytogenes é morta durante a pasteurização e durante a cozedura dos alimentos, porém, nas cadeias de pronto-a-comer, os alimentos podem ser contaminados após terem sido cozinhados. É o que acontece com os cachorros quentes e a charcutaria que são contaminados durante o seu processamento (Lecuit, 2007).

2.1.5.6 Patogénese e manifestações clínicas de *L. monocytogenes*

A infecção por *L. monocytogenes* é mais comum em crianças, idosos e grávidas, porém, também ocorre em pacientes que estejam sob medicação imunossupressora ou em indivíduos imunocromprometidos (cancro, doenças auto-imunes, alcoolismo e diabetes mellitus) (Cossart, 2007).

O seu período de incubação é normalmente longo (cerca de 3 semanas) e os surtos podem ocorrer 3 a 70 dias após a exposição ao patogénico. Isto torna difícil o isolamento da fonte de contaminação, nos casos esporádicos (Lecuit, 2007).

L. monocytogenes causa duas formas de listeriose: gastrointestinal não-invasiva e listeriose invasiva. Em indivíduos imunocompetentes, a listeriose não-invasiva provoca uma gastroenterite febril típica. Em adultos imunocomprometidos pode causar septicemia ou meningo-encefalite (Allerberger & M., 2010).

A listeriose invasiva pode ser transmitida da mãe infectada para o feto através da placenta. A listeriose durante a gravidez pode ser uma doença muito grave, sendo que 1/3 dos casos de cultura-positiva para *L. monocytogenes* em infecções materno-fetais resultam em aborto ou natimorto (Allerberger & M., 2010). Isto porque *L. monocytogenes* consegue resistir dentro da célula, matando os macrófagos. A primeira infecção por *Listeria* induz uma resposta imunitária celular protectora, sendo que os anticorpos não possuem qualquer papel crítico na recuperação da infecção nem na protecção contra infecções secundárias (Cossart, 2007).

Para além disso, *L. monocytogenes* consegue atravessar a barreira intestinal, disseminando-se dos nódulos linfáticos mesentéricos para o baço e fígado. Se o sistema imunitário do hospedeiro não é eficaz na remoção deste patogénico (principalmente ao nível do baço e fígado), a infecção espalha-se podendo provocar uma bacteremia prolongada e assintomática. Se atingir o cérebro ou a placenta, a infecção pode evoluir para meningite ou encefalite (normalmente em pacientes imunocomprometidos), provocando abortos em grávidas e infecção generalizada em recém-nascidos (Cossart, 2007) (Lecuit, 2007).

Para além de conseguir atravessar a barreira intestinal e a barreira materno-fetal, *L. monocytogenes* também possui a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, atingindo o Sistema Nervoso Central (SNC). A sua capacidade de provocar meningite e infecção cerebral parenquimal em simultâneo diferencia esta bactéria das restantes bactérias causadoras de meningite (como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*) (Lecuit, 2007).

A meningite provocada por *L. monocytogenes* é a que possui a maior taxa de mortalidade (22%) (Drevets & Bronze, 2008).

Evidências epidemiológicas mostraram que a ingestão de alimentos altamente contaminados com *L. monocytogenes* podem provocar listeriose em menos de 24h e gastroenterite grave, em indivíduos saudáveis (Cossart, 2007).

2.2 Níveis de Organização das Bactérias

Os microrganismos podem crescer isolados (células plasmáticas) ou em comunidades polimicrobianas interdependentes muito ricas e complexas denominados biofilmes (Wong, 1998).

Existem diversas bactérias que possuem a capacidade de formar biofilmes microbianos em superfícies abióticas. A formação destes biofilmes pode estar na origem de intoxicações alimentares que ocorrem devido a contaminação cruzada, ou seja, quando alimentos que são recentemente manipulados entram em contacto com superfícies contendo biofilmes, contaminando-os (Kim, Ryu, & Beuchat, 2007).

Para além disso, os biofilmes microbianos são consideravelmente mais resistentes à desinfecção, comparativamente com as bactérias isoladas. Verificou-se que os biofilmes bacterianos desenvolvidos em diversas superfícies ficaram 150 a 3000 vezes mais resistentes ao ácido hipocloroso (cloro livre, pH 7,0) e 2 a 100 vezes mais resistentes à desinfecção com monoclóramina do que as células plasmáticas (Baker, Hegarty, Redmond, Reed, & Herson, 2002).

Esta capacidade resistente dos biofilmes pode dever-se ao facto dos microrganismos ficarem retidos nas partículas ou adsorvidos à superfície permanecendo, deste modo, protegidos de qualquer acção desinfetante (Baker, Hegarty, Redmond, Reed, & Herson, 2002).

2.2.1 Biofilmes

Os biofilmes são matrizes de células biologicamente activas e substâncias extracelulares que estão associadas a superfícies sólidas (Wong, 1998).

Os biofilmes têm suscitado um enorme interesse no contexto alimentar porque muitas bactérias patogénicas alimentares (como *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, *E.coli* enterohemorrágica e *Listeria*) possuem a capacidade de crescer e persistir em superfícies em contacto com os alimentos (Joseph, Otta, & Karunasagar, 2001). De facto, tanto na natureza como em sistemas de processamento de alimentos, os microrganismos conseguem estabelecer uma ligação e desenvolverem-se em superfícies sólidas quando os nutrientes aí disponíveis são suficientes para o seu crescimento viável (Kumar & Anand, 1998).

A formação de biofilmes é um processo dinâmico no qual estão envolvidos diferentes mecanismos de aderência e crescimento microbiano. Este processo complexo inicia-se com o contacto do microrganismo com a superfície sólida ao qual este adere, cresce e se multiplica, até formar uma colónia de células. Durante esta etapa, os microrganismos formam polímeros orgânicos que são um dos componentes fundamentais para o sucesso da colonização microbiana. O número de células vai-se tornando cada vez maior até serem capazes de reter componentes orgânicos e inorgânicos, nutrientes e outros microrganismos, levando à formação do biofilme microbiano (Kumar & Anand, 1998).

Nos sistemas de processamento de alimentos, os biofilmes de bactérias patogénicas constituem um grave problema pois podem ser uma fonte contínua de contaminação dos alimentos com os quais contactam (Joseph, Otta, & Karunasagar, 2001).

Apesar de não se conhecerem completamente os mecanismos que permitem a determinadas estirpes bacterianas persistirem em sistemas de processamento de alimentos, vários estudos têm demonstrado que esta persistência está relacionada com a capacidade destas estirpes formarem biofilmes, sobrevivendo à acção bactericida dos desinfectantes (Pan, Breidt Jr., & Kathariou, 2006).

Os biofilmes possuem uma enorme importância médica, sendo responsáveis por mais de 80% das infecções microbianas no corpo humano (Mohamed & Huang, 2007).

2.3 Acumulação de bactérias em ambientes de processamento de alimentos

Algumas estirpes bacterianas são conhecidas pela sua capacidade de persistir no ambiente de processamento de alimentos durante longos períodos de tempo, como é o caso de algumas estirpes de *L. monocytogenes* que conseguem persistir nestes ambientes por períodos de 10 anos (Pan, Breidt Jr., & Kathariou, 2006).

A contaminação cruzada é descrita como um dos principais problemas a ter em conta durante o processamento. Esta ocorre devido ao facto dos biofilmes poderem persistir nas superfícies por deficiente acção dos agentes desinfectantes. Esses locais são habitualmente juntas, cantos, pontos de conexão, extremidades de tubos, ou outros locais onde a desinfecção é difícil.

Para além disso, os biofilmes bacterianos conseguem desenvolver-se em diversos tipos de equipamentos e superfícies. Vários estudos demonstraram a capacidade dos biofilmes de se formarem em superfícies de materiais em contacto com os alimentos e tão diversas como o aço inoxidável, o Teflon, o plástico, a borracha, o vidro (procurar mais artigos).

Os recentes avanços em técnicas de processamento, conservação e armazenamento têm permitido à indústria dos vegetais apresentar aos consumidores uma gama de produtos cada vez mais alargada e em quantidades cada vez maiores (Hanning, Nutt, & Ricke, 2009).

De um modo geral, o consumo de produtos frescos crus é considerado seguro e a maioria dos surtos alimentares são associados a alimentos de origem animal. Porém, o potencial de contaminação é proveniente, em muitos aspectos, das práticas na produção dos vegetais.

Os frutos frescos e os vegetais podem ser contaminados durante as práticas de cultivo, manipulação e processamento dos mesmos. Devido à ausência de métodos de conservação no processamento dos vegetais, existe um risco elevado de populações microbianas contaminarem e deteriorarem os produtos (Lahiri, Das, & Chakravorty, 2009).

Assim, para garantir a segurança alimentar na produção de um produto, é necessário adoptarem-se medidas relacionadas com a produção do mesmo. De entre estas medidas incluem-se os programas de higienização (limpeza e desinfecção) das instalações, dos equipamentos, dos utensílios e das superfícies que contactam directa ou indirectamente com os produtos alimentares, podendo contaminá-los (Baptista, 2003).

2. Programas de Higienização e Desinfecção

Os procedimentos de limpeza e desinfecção são a forma mais eficaz de controlar os microrganismos, em particular as bactérias que sobrevivem nos sistemas de processamento dos alimentos e podem ser causadoras de doenças alimentares graves (Walton, Hill, Protheroe, Nevill, & Gibson, 2008).

A implementação de um programa de higienização eficaz e adequado às necessidades de cada instalação pressupõe a utilização de agentes de limpeza e desinfecção compatíveis com a indústria alimentar; o estabelecimento de programas de limpeza e desinfecção que contemplem os procedimentos, a frequência e a responsabilidade associados às respectivas actividades; a realização de testes que comprovem a eficácia do programa de limpeza e desinfecção, e também o registo das acções correctivas implementadas (Mounier, Pestourie, Ploy, & Denis, 2009).

Os programas de higienização na indústria alimentar contemplam dois tipos de processos com acção distinta mas complementar: os processos de limpeza e os processos de desinfecção.

3.1 Processos de limpeza

Os processos de limpeza são os primeiros a ser efectuados e têm como objectivo a eliminação da sujidade das superfícies, principalmente da matéria orgânica (como gorduras e proteínas) que pode servir de suporte nutritivo para o desenvolvimento de microrganismos ou reagir com os desinfectantes, neutralizando a sua acção (Baptista, 2003).

Os procedimentos de limpeza recorrem ao uso de detergentes que, não sendo agentes antimicrobianos, removem comida e contaminações da superfície; seguidos da aplicação de desinfectantes que reduzem a viabilidade dos microrganismos sobreviventes (Walton, Hill, Protheroe, Nevill, & Gibson, 2008).

Finalizado o processo de limpeza, é essencial efectuar o processo de desinfecção, uma vez que o primeiro não possui qualquer tipo de acção bactericida e, para além disso, o biofilme do detergente que se forma quando as superfícies e os utensílios ficam secos, constitui um excelente meio de cultura para os microrganismos (Baptista, 2003).

3.2 Processos de desinfecção

A desinfecção tem como principal objectivo a remoção e/ou eliminação de microrganismos, em especial os patogénicos que possam estar presentes nas superfícies ou utensílios e que são responsáveis pela contaminação dos alimentos (Weber, Rutala, & Sickbert-Bennett, 2007).

A aplicação exclusiva da desinfecção como forma de prevenir e controlar a contaminação microbiológica resultaria em deficiências na higienização, uma vez que a sujidade constitui uma barreira física e química que tem de ser previamente eliminada, através da limpeza, para otimizar a desinfecção (Baptista, 2003).

3. Desinfectantes

Os desinfectantes são produtos que destroem ou inibem o crescimento de microrganismos e são aplicados em superfícies ou objectos inanimados (McDonnell & Russell, 1999). Como tal, são considerados biocidas.

‘Biocida’ é um termo geral usado para descrever um agente químico, geralmente com um amplo espectro de acção, que inactiva microrganismos. Como os biocidas possuem diferentes gamas de actividade antimicrobiana, outros termos são usados com mais frequência, nomeadamente termos com o sufixo “-estático”, que se referem a agentes que inibem o crescimento microbiano

(ex: bacterioestático) ou “-cida”, que se referem a agentes que matam o microrganismo (ex: bactericida). Os biocidas incluem os antissépticos, os conservantes e os desinfetantes (Russel, 2002).

Enquanto os antissépticos são substâncias antimicrobianas normalmente aplicadas na pele ou mucosas para reduzir a flora microbiana, os desinfetantes são substâncias aplicadas a objectos inanimados para destruir microrganismos potencialmente perigosos (não sendo muitas vezes eficazes na eliminação de esporos bacterianos) (Weber, Rutala, & Sickbert-Bennett, 2007).

No início do século XX, os desinfetantes começaram a ser usados para diferentes propósitos, sendo o fenol (ácido carbólico), o cloreto de mercúrio, o cloro, os hipocloritos e a iodina os desinfetantes mais utilizados. Os compostos quaternários de amónia (QACs) foram descritos em 1916 mas só começaram a ser comercializados 19 anos depois (Russel, 2002).

Os primeiros estudos da acção dos desinfetantes baseavam-se na cinética de inactivação bacteriana e descreviam a interacção de compostos fenólicos com proteínas bacterianas, evidenciando a importância desse conhecimento para a compreensão do mecanismo de desinfectação.

Nos últimos anos, o uso alternado de diferentes desinfetantes em locais onde estes são usados com maior frequência (ex: indústria alimentar) tem sido recomendada, como forma de prevenir o desenvolvimento de resistências bacterianas. De acordo com esta política, o ideal seria substituir um desinfetante por outro contendo um modo de acção diferente. Isto pressupõe que o conhecimento sobre o mecanismo de acção destes agentes seja conhecida. Daí a necessidade cada vez maior de se investigar a natureza dos efeitos inibitórios e letais dos desinfetantes em diversas espécies microbianas (Russel, 2002).

4.1 Importância dos desinfetantes na indústria alimentar

Nos processos de desinfectação o papel mais importante corresponde aos desinfetantes [9]. Segundo os organismos internacionais como a ISO, um bom agente desinfetante deve ser: letal

para os microrganismos, estável, homogéneo, resistente à matéria orgânica, eficaz à temperatura ambiente, ser capaz de penetrar nas superfícies, não corrosivo nem tóxico para o Homem e de fácil aplicação.

Porém, todos os agentes desinfectantes apresentam um conjunto de limitações que reduzem o seu campo de aplicação. Estas limitações podem resultar das características dos próprios desinfectantes, das características das superfícies a desinfectar ou dos próprios sistemas de desinfecção (Baptista, 2003).

4.2 Grau de eficácia dos desinfectantes

A concentração mínima inibitória (CMI) é o parâmetro que permite avaliar qual a concentração mínima necessária para um desinfectante inibir o crescimento de um determinado microrganismo. Porém, as concentrações de uso normais dos desinfectantes nunca devem ser escolhidas com base na CMI. Isto porque, ao contrário dos antibióticos, o objectivo é matar rapidamente as bactérias, numa questão de minutos. Basear-se na CMI para avaliar e comparar a actividade de desinfectantes pode levar a falsas conclusões, uma vez que não existe uma relação universal entre a CMI e a concentração mínima bactericida (CMB) (Cerf, Carpentier, & Sanders, 2010).

O tempo é uma dimensão fundamental no contexto dos desinfectantes, assim como o pH que também é um factor importante na actividade de alguns desinfectantes.

Os desinfectantes são usados numa extensa gama de temperaturas que pode ir dos 0°C aos 100°C. A ineficácia da desinfecção ocorre quando o número de bactérias sobreviventes é maior do que o esperado. Em condições experimentais, a baixa concentração do desinfectante resulta na falha da sua actividade bactericida. Duas causas podem levar a esta situação (para além da sub-dosagem intencional feita pelo operador): a diluição e as substâncias de interferência (Cerf, Carpentier, & Sanders, 2010).

Normalmente, a diluição do desinfectante ocorre devido à existência de água em sítios que deveriam estar secos, mas não estão. Esta situação é comum em instalações da indústria alimentar e pode ocorrer em mesas, no chão, em sistemas de drenagem, calhas e ralos com declives insuficientes para escoar a água. Um desses exemplos é as tubagens em U que hospedam uma diversidade de microflora.

Mesmo se forem respeitadas as concentrações de uso normais noutras superfícies, o desinfectante irá sofrer uma diluição nas águas estagnadas. Assim, os microrganismos que permanecem nos locais mais recônditos irão escapar à acção mecânica da limpeza e ficarão protegidos pela sujidade que se irá acumular nesse local. Assim, a concentração de desinfectante pode ser insuficiente se não for tida em conta a matéria orgânica de interferência, por exemplo, em superfícies que foram insuficientemente limpas (Cerf, Carpentier, & Sanders, 2010).

4.3 Classes de biocidas usados em desinfectantes

Os desinfectantes são utilizados em diversos tipos de superfícies sólidas e constituem uma prática essencial no controlo da infecção. A crescente preocupação com as contaminações microbianas dos alimentos e os riscos de infecção associados levou ao aumento do uso de desinfectantes pelo público em geral. Os desinfectantes são produtos que possuem diversos agentes químicos activos (ou ‘biocidas’), alguns dos quais têm sido usados há centenas de anos. Porém, a informação sobre o mecanismo de acção destes agentes activos é deficiente, comparativamente à informação que se conhece sobre o mecanismo de acção dos antibióticos. De um modo geral, os biocidas possuem um amplo espectro de acção e diversos alvos celulares (McDonnell & Russell, 1999).

Na tabela I são apresentados os vários tipos de biocidas usados em desinfectantes e as respectivas estruturas químicas. Muitos destes biocidas podem ser usados individualmente ou em combinação com outros biocidas, numa variedade de produtos cuja actividade antimicrobiana pode variar consideravelmente.

4.3.1 Álcoois

Vários álcoois possuem actividade antimicrobiana eficaz, sendo o álcool isopropílico (isopropanol, propan-2-ol) e o *n*-propanol (em particular na Europa) os mais utilizados. Os álcoois possuem um amplo espectro de acção antimicrobiana contra bactérias vegetativas. São frequentemente utilizados para desinfectar superfícies sólidas e o seu uso em baixas concentrações pode potenciar a actividade de outros biocidas. O álcool isopropílico é geralmente eficaz na eliminação de bactérias, porém, esta condição depende da concentração a que o produto é utilizado e das estirpes bacterianas presentes na superfície a desinfectar. O álcool isopropílico possui elevadas propriedades lipofílicas e deve ser usado em concentrações compreendidas entre 60 e 90%, para possuir uma acção antimicrobiana eficaz.

4.3.1.1 Mecanismo molecular de acção dos álcoois

Pouco se conhece acerca do mecanismo de acção dos álcoois, porém, a hipótese é a de que estes compostos causam danos na membrana celular das bactérias e rápida desnaturação das proteínas, interferindo com o normal funcionamento do metabolismo da bactéria, provocando a lise da célula.

4.3.2 Aldeídos

O glutaraldeído é um dialdeído frequentemente utilizado como desinfectante e possui um amplo espectro de acção contra bactérias e esporos bacterianos. O glutaraldeído liga-se fortemente à membrana externa de microrganismos como *E. coli* e *Staphylococcus aureus*; inibe o transporte em bactérias Gram-negativas; inibe a actividade da desidrogenase e de enzimas periplásmicas; impede a lise induzida por lisostafina em *S. aureus* e a lise induzida por lauril sulfato de sódio em *E.coli*; inibe a lise de protoplastos e de esferoplastos em meio hipotónico; e inibe a síntese de RNA, DNA e síntese proteica. O glutaraldeído possui também uma forte interacção com a lisina e outros aminoácidos.

4.3.2.1 Mecanismo molecular de acção dos aldeídos

O mecanismo de acção do gluteraldeído envolve uma associação forte com a membrana externa das células bacterianas, especificamente com aminas desprotonadas existentes na superfície celular, sendo estes os locais de reactividade deste composto. E, portanto, a gluteraldeído é mais eficiente a pHs alcalinos do que a pHs ácidos, pois quando o meio é alcalino são formados mais locais de reactividade na superfície celular, tornando o efeito bactericida deste composto mais rápido. As ligações daí resultantes não permitem à célula retomar algumas- ou mesmo todas -as suas funções essenciais.

4.3.3 Biguanidas

As biguanidas poliméricas são agentes desinfectantes usados na indústria alimentar, sendo o Vantocil um exemplo comercial. O Vantocil é uma mistura heterodispersa de biguanida de polihexametileno (PHMB) com uma massa molecular próxima de 3,000. É eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, porém, é menos sensível contra *P. aeruginosa*.

4.3.3.1 Mecanismo molecular de acção das biguanidas

O PHMB é um agente que actua ao nível da membrana, alterando a integridade da membrana externa de bactérias Gram-negativas. Pensa-se que o mecanismo de acção do PHMB esteja relacionado com sua polimerização e consequente aumento da massa molecular que interfere com a membrana interna. O PHMB é responsável pela formação de domínios de fosfolípidos ácidos na membrana citoplasmática, alterando a sua permeabilidade e, possivelmente, a função de algumas enzimas associadas à membrana. A sequência de eventos proposta da interacção entre o PHMB e o invólucro celular de *E. coli* é a seguinte: (i) existe uma atracção do PHMB para a carga negativa da superfície celular bacteriana com uma adsorção forte e específica a compostos contendo fosfato; (ii) a integridade da membrana externa fica comprometida e o PHMB é “atraído” para a membrana interna; (iii) o PHMB liga-se aos fosfolípidos, aumentando a permeabilidade da membrana interna

(perda de iões K^+) acompanhada de bacteriostasis e, por fim, (iv) a membrana perde totalmente a sua função, havendo precipitação dos constituintes intracelulares e um efeito bactericida.

4.3.4 Compostos Libertadores de Halogéneo

Os compostos à base de cloro são os halogéneos microbicidas mais utilizados para desinfecção. Dos compostos libertadores de cloro (CLC), as soluções de hipoclorito de sódio (ou, vulgarmente, lixívia) e o dicloroisocianurato de sódio (NaDCC) são os compostos mais utilizados para desinfectar superfícies sólidas. A utilização do NaDCC é mais vantajosa pois este composto possui uma maior concentração de cloro activo e é menos susceptível à inactivação pela matéria orgânica.

Em água, o hipoclorito de sódio ioniza-se produzindo iões Na^+ e OCl^- que estabelecem um equilíbrio com o ácido hipocloroso ($HOCl$). A pH 4-7, o cloro existe predominantemente como $HClO$, enquanto a pH 9, prevalece o ião OCl^- .

4.3.4.1 Mecanismo molecular de acção dos CLC

Os CLC são agentes oxidantes muito activos e, como tal, inibem a actividade celular das proteínas. O processo de oxidação ocorre a baixo pH, onde a actividade dos CLC é máxima, embora a entrada destes compostos na membrana externa ocorra, provavelmente, na sua forma desionizada. A actividade dos CLC é maior quando a percentagem de $HOCl$ não dissolvido é maior. Os CLC provocam deleções no DNA bacteriano, num processo que envolve a formação de derivados de bases nucleotídicas cloradas. O ácido hipocloroso interrompe a fosforilação oxidativa e a actividade associada à membrana externa, porém, a síntese do DNA é o processo alvo deste composto.

4.3.5 Compostos de Prata

A sulfadiazina de prata (AgSD) é uma combinação de dois agentes bacterianos: a prata (Ag^+) e a sulfadiazina (SD). A AgSD possui um amplo espectro de acção antimicrobiana e induz a formação de protuberâncias à superfície e na membrana celular de bactérias susceptíveis (mas não nas resistentes).

4.3.5.1 Mecanismo molecular de acção dos compostos de prata

A AgSD liga-se a componentes celulares, incluindo o DNA. Apesar de não se conhecer o modo exacto de como a AgSD inibe as bactérias, o mecanismo proposto envolve a ligação da prata aos pares de bases da hélice do DNA, levando à inibição da transcrição.

4.3.6 Peróxidos

O peróxido de hidrogénio (ou, vulgarmente, água oxigenada) é um biocida muito usado para a desinfecção. O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é um composto ecológico e deve ser usado em concentrações compreendidas entre 3 e 90%. De um modo geral, o H_2O_2 é eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas; porém, a presença da catalase e outras peroxidases nestas bactérias pode torná-las rapidamente tolerantes a este composto, principalmente se o H_2O_2 for usado a baixas concentrações.

O ácido peracético (PAA) é um biocida mais potente que o H_2O_2 , possuindo acção bactericida a muito baixas concentrações (< 0.3%). O PAA também se decompõe em produtos ecológicos e possui as vantagens, relativamente ao H_2O_2 , de não ser decomposto por peroxidases e permanecer activo na presença de resíduos orgânicos.

4.3.6.1 Mecanismo molecular de acção dos peróxidos

O H_2O_2 actua como um oxidante produzindo radicais hidróxido livres ($\cdot OH$) que atacam componentes celulares incluindo lípidos, proteínas e DNA. Tem sido sugerido que os grupos sulfidril expostos e as duplas ligações sejam os alvos preferenciais deste composto.

Semelhante ao H_2O_2 , o PAA provavelmente desnatura proteínas e enzimas e aumenta a permeabilidade da parede celular através da quebra de grupos sulfidril ($-SH$) e pontes dissulfídricas ($S-S$).

4.3.7 Fenóis

Os fenólicos antimicrobianos têm sido usados como desinfectantes devido às suas propriedades activas ao nível das membranas celulares.

O fenol induz uma perda gradual dos constituintes intracelulares incluindo a libertação de K^+ , um dos primeiros indícios de danos na membrana celular. Baixas concentrações de fenóis (0,032%) lisam rapidamente culturas de *E.coli*, *Staphylococci* e *Streptococci* num processo que não envolve enzimas autolíticas.

4.3.7.1 Mecanismo molecular de acção dos fenóis

Pensa-se que o fenol actua na fase de divisão do ciclo celular, quando as duas células-filhas se separam, havendo evidências de que as células bacterianas jovens são mais sensíveis ao fenol do que as células mais velhas.

4.3.8 Halofenóis

O cloroxilenol é o halofenol mais usado em formulações de desinfectantes. É um agente bactericida, porém, *P. aeruginosa* é altamente resistente a este composto. Apesar de ser um desinfectante usado há muitos anos, pouco se conhece acerca do seu mecanismo de acção.

4.3.8.1 Mecanismo molecular de acção dos halofenóis

Devido à sua natureza fenólica, espera-se que o cloroxilenol possua um efeito bactericida ao nível da membrana celular.

4.3.9 Compostos Quaternários de Amónia (QACs)

Os agentes tensioactivos – ou surfactantes – possuem duas regiões na sua estrutura molecular: um grupo hidrocarboneto hidrofóbico e um grupo polar ou hidrofílico. Os surfactantes podem ser classificados como compostos catiónicos, aniónicos, não iónicos ou anfotéricos (anfotéricos). Os surfactantes catiónicos são os desinfectantes mais eficientes, sendo os QACs um desses exemplos.

Os QACs possuem propriedades antimicrobianas e são excelentes agentes de limpeza. São compostos que actuam ao nível da membrana, ou seja, cujo alvo celular é a membrana citoplasmática (ou interna) da bactéria.

4.3.9.1 Mecanismo molecular de acção dos QACs

O mecanismo de acção proposto para os surfactantes catiónicos inclui a seguinte sequência de eventos: (i) adsorção e entrada do agente químico na parede celular bacteriana; (ii) interacção com a membrana citoplasmática (lipídica ou proteica) seguida de destabilização da membrana; (iii) perda de material intracelular de baixo peso molecular; (iv) degradação das proteínas e ácidos nucleicos e (v) lise da parede celular por enzimas autolíticas. Como consequência, a membrana citoplasmática da bactéria perde a sua estrutura organizacional e a sua integridade, acompanhada por outros efeitos prejudiciais na célula.

4.3.9 Novos desinfetantes

O *o*-ftalaldeído (OPA) é um novo tipo de desinfetante com uma elevada acção bactericida. O OPA é um composto aromático com dois grupos aldeídos e tem sido sugerida a substituição do gluteraldeído por este composto.

4.3.10.1 Mecanismo molecular de acção do OPA

Estudos preliminares sugerem que o mecanismo de acção do OPA seja semelhante ao do gluteraldeído, porém, é necessário efectuar mais estudos que apoiem esta hipótese.

A desinfecção é, provavelmente, a condição mais stressante que as bactérias podem experienciar, num ambiente típico de processamento alimentar (Pan, Breidt Jr., & Kathariou, 2006). Contudo, como são usados há mais de cem anos, a eficácia dos agentes desinfetantes tem suscitado preocupações devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência que os microrganismos criam a estes compostos (Davidson & Harrison, 2002).

4.4 Resistência bacteriana aos desinfectantes

A resistência de um microrganismo a agentes antibacterianos pode ser natural (intrínseca) ou adquirida por mutação, aquisição de plasmídeos (auto-replicação, DNA extracromossomal) ou de transposões (integração cromossômica ou plasmídica, transmissão de *cassettes* de DNA).

A resistência intrínseca ocorre em bactérias Gram-negativas e, em determinadas condições, em *Staphylococcus*. A resistência adquirida mediada por plasmídeos está geralmente associada a compostos de mercúrio e outros sais metálicos. Nos últimos anos tem-se verificado a ocorrência de resistência adquirida a certos tipos de biocidas por *Staphylococcus*.

4.4.1 Mecanismos de resistência inata

Para as moléculas do desinfectante atingirem o seu alvo necessitam de atravessar as membranas exteriores da célula. A natureza e composição das membranas variam consoante o tipo de organismo e geralmente actuam como barreiras permeáveis. Em alternativa (embora com menos frequência) são sintetizadas enzimas constitutivamente que degradam os compostos.

A resistência inata (intrínseca) é uma propriedade natural das células bacterianas, controlada pelos cromossomas e que permite bloquear a acção do desinfectante. As bactérias Gram-negativas tendem a ser mais resistentes aos desinfectantes do que os organismos Gram-positivos, como *Staphylococcus*.

4.4.1.1 Mecanismos de resistência inata em Gram-positivas

A parede celular de *Staphylococcus* é composta essencialmente por peptidoglicano e ácidos teicóicos. Porém, nenhum destes constituintes parece ser uma barreira eficaz à entrada de desinfectantes na célula. O facto de substâncias de elevado peso molecular conseguirem atravessar facilmente a parede celular de *Staphylococcus* pode explicar a sensibilidade destes organismos a muitos agentes antibacterianos como os QACs e a clorexidina.

Porém, a plasticidade do invólucro celular é um fenómeno bastante bem conhecido. A taxa de crescimento e os nutrientes limitantes do crescimento afectam o estado fisiológico das células. Sob determinadas circunstâncias, a espessura e o grau de ligações inter cruzadas do peptidoglicano podem modificar-se e, conseqüentemente, a sensibilidade celular aos desinfectantes também é alterada.

Na natureza, *S. aureus* podem subsistir como estirpes mucóides, com as células rodeadas por uma camada viscosa. As estirpes não mucóides são mortas mais rapidamente por cloroxilenol, cetrimida e clorexidina, do que as estirpes mucóides. Porém, quando se usam fenóis ou fenóis clorados, essa diferença é muito pequena. Para além disso, a remoção da camada viscosa através da lavagem tornam as células sensíveis. Assim, a camada viscosa possui um papel protector pois actua como uma barreira física à penetração do desinfectante e interage com (ou absorve) as moléculas biocidas.

4.4.1.2 Mecanismos de resistência inata em Gram-negativas

As bactérias Gram-negativas são geralmente mais resistentes aos desinfectantes. Existe uma diferença considerável entre a sensibilidade de *S. aureus* e *E. coli* aos QACs (benzalcónio, benzetónio e cetrimida), hexaclorofeno, diamidinas e triclosan mas uma diferença mínima na susceptibilidade de à clorexidina. *P. aeruginosa* é consideravelmente mais resistente à maioria destes agentes, incluindo a clorexidina.

A membrana externa das bactérias Gram-negativas actua como uma barreira que limita a entrada de muitos tipos de agentes químicos antibacterianos.

As moléculas hidrofóbicas de baixo peso molecular ($M_r < 600$) passam rapidamente para o interior das células Gram-negativas através de porinas, enquanto as moléculas hidrofóbicas atravessam a dupla membrana externa por difusão. Em bactérias Gram-negativas *wild-type*, moléculas LPS intactas impedem a interacção das moléculas hidrofóbicas aos fosfolípidos e, conseqüentemente, impedem a sua entrada no interior da célula. No caso dos agentes catiónicos

como os QACs, biguanidas e diamidinas, foi proposto um terceiro mecanismo no qual estes compostos provocam danos na membrana externa, promovendo a sua entrada na célula.

P. aeruginosa é um exemplo de bactéria Gram-negativa que possui um elevado nível de resistência a desinfetantes. A membrana externa de *P. aeruginosa* é a principal responsável pela sua elevada resistência, havendo diferenças na composição de LPS e na quantidade de cátions na membrana externa desta bactéria, comparativamente com outras Gram-negativas. Assim, como a elevada quantidade de Mg^{2+} promove ligações fortes LPS-LPS e, devido ao seu pequeno tamanho, as porinas podem não permitir a sua difusão para o interior da célula; pode ser este o mecanismo responsável pela elevada resistência de *P.aeruginosa* aos desinfetantes.

Também existe a possibilidade da membrana citoplasmática (interna) ser a responsável pelo mecanismo de resistência inata. Como a membrana citoplasmática é composta por lipoproteínas, estas podem impedir a difusão passiva de moléculas hidrofílicas para o interior da célula. Também se sabe que alterações na composição da membrana afectam a sensibilidade da bactéria ao etanol. Porém, ainda existem poucas evidências que relacionem a membrana interna à resistência aos biocidas.

4.4.1.3 Adaptações fenotípicas

A associação de microrganismos com superfícies sólidas leva à formação de biofilmes, definidos como um conjunto de organismos associados a um extenso exopolímero exopolisacárido. Os biofilmes podem formar-se a partir de monoculturas de diferentes espécies ou a partir de diversos fenótipos da mesma espécie. Os biofilmes são extremamente importantes por várias razões: biocorrosão, diminuição da qualidade da água, e focos de contaminação de produtos higiénicos.

As bactérias experienciam diferentes ambientes nutritivos dentro do biofilme, o que faz com que as suas propriedades fisiológicas sejam afectadas. Assim, o fenótipo dos organismos sésseis no biofilme é consideravelmente diferente das células plasmónicas que existem em culturas laboratoriais.

Diversas razões podem explicar a reduzida sensibilidade das bactérias quando estão na forma de biofilme: (i) o desinfetante não consegue aceder às células no interior do biofilme; (ii) interacção química entre o desinfetante e o próprio biofilme; (iii) modulação do microambiente; (iv) produção de enzimas degradativas (e neutralizantes químicos) ou (v) trocas genéticas entre as células do biofilme. Porém, de um modo geral, as bactérias que são removidas do biofilme e colocadas novamente em meios de cultura não apresentam uma maior resistência do que as células plasmónicas “normais” da sua espécie.

Foi descrita uma nova estratégia para controlar os biofilmes através da produção de peróxido de hidrogénio na interface biofilme-superfície, em vez da aplicação simples do desinfetante extrinsecamente. Neste tipo de procedimento, a superfície colonizada por bactérias incorpora um catalisador que gera compostos activos a partir do agente de tratamento.

A interacção das bactérias com as superfícies é normalmente um processo reversível (embora por vezes seja irreversível). A adesão irreversível é iniciada pela ligação da bactéria à superfície, através dos polímeros extrapoliassacáridos do glicocálix. As células irmãs que se vão formando por divisão celular são ligadas à matriz do glicocálix. O desenvolvimento de microcolónias aderentes é então iniciado, havendo produção de um biofilme contínuo na superfície colonizada.

As bactérias que vivem nos biofilmes experienciam um microambiente específico que difere das condições laboratoriais normais de crescimento e, portanto, mostram diferenças na sua resposta aos desinfetantes.

Os biofilmes são um dos exemplos mais importantes de como a adaptação fisiológica (fenotípica) pode conferir resistência intrínseca (inata).

Porém são conhecidos outros exemplos: muitos microrganismos aeróbios desenvolveram sistemas de defesa intrínsecos que conferem tolerância ao stress provocado por peróxidos (em particular por peróxido de hidrogénio) *in vivo*. A chamada resposta SOS (stress oxidativo) tem sido muito estudada em *E. coli* e *Salmonella* e inclui a produção de enzimas neutralizantes para prevenir danos celulares (incluindo peroxidases, catalases, glutathione reductase) e reparar lesões no DNA (como por exemplo a exonuclease III). Em ambos os organismos, o aumento de tolerância pode ser obtido através do pré-tratamento com doses sub-inibitórias de peróxido de hidrogénio. O pré-tratamento inclui uma série de proteínas, muitas das quais estão sob controlo positivo de uma proteína reguladora (OxyR) como a catalase e a glutathione reductase; e outras proteínas não essenciais que se acumulam para proteger a célula.

Também têm sido reportadas resistências cruzadas ao calor, ao etanol e ao ácido hipocloroso.

4.4.2 Mecanismos de resistência adquirida

A aquisição de resistência adquirida aos desinfetantes pode ser obtida por mutação ou pela aquisição de material genético na forma de plasmídeos ou transposões.

“Resistência” ou aumento da MIC (concentração mínima inibitória) de um biocida não está necessariamente relacionado com falha terapêutica. O aumento das MICs dos biocidas devido a mecanismos adquiridos também têm sido reportados e, em alguns casos, mal interpretados pois são tidos como indicadores de resistência. É importante que questões relacionadas com acções pleiotrópicas de biocidas, actividade bactericida, concentrações usadas em produtos, aplicações directas do produto, efeitos da formulação, etc, sejam consideradas quando se avaliam as implicações clínicas destas variáveis.

4.4.2.1 Resistência adquirida por plasmídeos

Ao contrário da prata, outros metais e organomercúrios, os plasmídeos não eram habitualmente considerados os responsáveis pelos elevados níveis de resistência de determinadas espécies ou estirpes aos desinfetantes. Porém, quando a presença de plasmídeos em bactérias começou a ser associada ao aumento de tolerância à clorexidina, QACs e triclosan, este assunto foi reconsiderado. Por exemplo, sabe-se que a resistência ao mercúrio é um processo indutível, mediado por um plasmídeo e que pode ser transferido por conjugação ou transdução. A resistência ao mercúrio inorgânico (Hg^{2+}) e ao organomercúrio é uma propriedade comum de algumas estirpes de *S. aureus*. Plasmídeos que codificam resistência à prata são também encontrados em determinadas espécies de *Pseudomonas*.

4.4.2.1.1 Resistência adquirida por plasmídeos em Gram-negativas

O plasmídeo RP1 não altera significativamente a resistência de *P. aeruginosa* aos QACs, clorexidina, iodina ou fenóis clorados, porém, aumenta a resistência ao hexacloropeno. Os elevados níveis de tolerância à clorexidina e aos QACs podem ser intrínsecos ou podem resultar de mutação. A hipótese é de que o uso extensivo destes agentes catiónicos pode ser responsável pela selecção das estirpes resistentes aos desinfetantes; porém, poucas evidências suportam esta hipótese. Todos os estudos demonstram a dificuldade em transferir a resistência à clorexidina e aos QACs em condições normais e que a resistência a estes desinfetantes mediada por plasmídeos é pouco frequente em Gram-negativas. Contrariamente, o plasmídeo R124 altera a proteína de membrana externa OmpF em *E. coli*, e as células contendo este plasmídeo são mais resistentes aos QACs (cetrimida) e a outros agentes.

Os mecanismos de resistência ao formaldeído e a biocidas industriais podem ser codificados por plasmídeos. Estes mecanismos incluem alterações na superfície celular (nomeadamente em proteínas da membrana externa) e alterações na formaldeído desidrogenase.

4.4.2.2 Resistência adquirida por mutações

A resistência à clorexidina pode ser induzida em alguns organismos (*Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens*) mas não em outros, como é o caso da *Salmonella enteritidis*, *E. coli* e *S. aureus*.

Estirpes de *P. aeruginosa* resistentes ao cloroxilenol foram isoladas após repetidas exposições em meios contendo concentrações gradualmente maiores de compostos fenólicos; porém, a resistência revelou-se instável. A adaptação de *P. aeruginosa* aos QACs é um fenómeno bem conhecido. Também existem estirpes de *P. aeruginosa* resistentes a surfactantes anfotéricos e estirpes com resistência cruzada à clorexidina. Isso implica que o mecanismo daí resultante seja não específico e envolva alterações celulares que modificam a resposta do organismo a agentes biocidas não relacionados. Alterações na membrana externa é um factor óbvio e já foi encontrado em estirpes de *P. aeruginosa* resistentes a QACs e a compostos anfotéricos. Estas alterações envolvem perfis de aminoácidos e, talvez mais importante, proteínas da membrana externa. O EDTA (Ácido etilenodiamidino tetra-acético) é um composto que altera a membrana externa de bactérias Gram-negativas, principalmente de pseudomonas. Assim, novamente, parece que o desenvolvimento de resistência está associado a alterações no invólucro celular, limitando a entrada do desinfectante na célula.

As populações bacterianas são maiores do que as esperadas (em condições de desinfecção ideais) porque algumas células aderentes conseguem sobreviver à desinfecção ou porque a limpeza não consegue remover todas as células aderentes ou preveni-las de voltarem a aderir à superfície; ou ainda porque algumas células se alojam em locais recônditos que escapam à acção do desinfectante.

Muitas vezes, sem se ter verificado se o desinfectante foi usado correctamente, alega-se que o mesmo é ineficaz ou que as bactérias se tornaram fenotipicamente ou genotipicamente adaptadas. Porém, a selecção de estirpes não modificadas deve ser também considerada. A selecção pode promover as estirpes a adquirirem uma força de aderência adequada e/ou *fitness* ao ambiente e/ou capacidade para competir com a restante microflora biológica. Mesmo se ocorrer adaptação

genotípica, permanece a questão de como é que tal adaptação genotípica a desinfetantes pode estar relacionada com adaptações a antibióticos.

Existem características importantes a ter em conta quando se estuda a resistência aos desinfetantes (Panos, Betsi, & Falagas, 2006). Essas características encontram-se resumidas na tabela II.

Tabela II: Principais características dos desinfetantes.

Desinfetantes	
Mecanismo de acção	Interacção com um ou mais componentes da célula
Descrição da população bacteriana	Mais resistente / menos resistente
Resultado esperado	Morte rápida de uma fracção da população bacteriana e sobrevivência de algumas células nas superfícies
Determinação da concentração activa	3 x 5 ou equivalente
Momento em que o resultado é observado	Durante o processo de morte das bactérias
Lavagem pós-aplicação	Lavagem das superfícies obrigatória para a maioria dos desinfetantes antes do contacto com os alimentos; lavagem para o processo de morte das bactérias
Escala do tempo de aplicação	Minutos
Temperatura de aplicação	< 0 a > 100 °C
Má utilização	Baixa concentração devido a diluição do desinfetante em água estagnada, e/ou aumento da resistência das células aderentes
Possíveis consequências da má utilização	Inibição de toda a população bacteriana de interesse, ou morte lenta de uma fracção da população de interesse e selecção de bactérias adaptadas, ou nenhum efeito

O conceito de resistência aos desinfetantes está em debate e deve estar associado ao método que é usado para medir ou comparar a resistência dos diferentes desinfetantes e a sua eficácia relativamente à morte ou a sobrevivência das bactérias alvo.

5 Enquadramento Normativo

Actualmente, a necessidade de se criarem normas é cada vez maior. Isto porque há uma preocupação crescente com a segurança, qualidade e eficácia dos produtos.

5.1 Legislação Mundial

Nos EUA, os desinfetantes encontram-se sob regulamentação da *Environmental Protection Agency (EPA)* e, portanto, estão sujeitos às regras desse órgão para a demonstração de eficácia e uso no contexto prático.

5.1.1 Legislação Europeia

O Comité Europeu de Normalização (CEN) é um importante legislador de Normas Europeias e especificações técnicas. É a única organização Europeia reconhecida nos termos da Directiva 98/34/CE para o planeamento, elaboração e adopção de Normas Europeias em todas as áreas da actividade económica (com excepção da electrotécnica e telecomunicações).

Os membros nacionais do CE 31 trabalham em conjunto para desenvolver Normas Europeias (EN) voluntárias. Essas normas têm um estatuto único, uma vez que são, também, normas nacionais de cada um dos 31 países-membros.

Como todos os países membros têm normas em comum, o produto pode chegar a um mercado muito mais amplo sem precisar de tanto desenvolvimento e com custos dos testes mais baixos. As Normas Europeias ajudam a construir um mercado interno europeu de bens e serviços, posicionando a Europa na economia global. Mais de 60.000 técnicos, bem como federações de empresas, consumidores e outras organizações de interesse da sociedade estão envolvidos na rede CEN, que atinge mais de 480 milhões de pessoas.

5.2.1 Métodos certificados para avaliar a actividade bactericida de desinfectantes

O CEN elaborou 13 protocolos para avaliar agentes bactericidas e outros 10 protocolos para esporos bacterianos, fungos ou vírus (Meyer, Morin, Rödger, Holah, & Bird, 2010).

5.2.2 Testes de suspensão quantitativa

Os métodos Europeus Normalizados para avaliar a actividade bactericida de um desinfectante baseiam-se na determinação da concentração de desinfectante que produz um determinado número de “reduções decimais” (denominadas “reduções log”) de uma população microbiana suspensa em meio líquido, durante um determinado tempo e a uma determinada temperatura (com ou sem a presença de uma ‘substância de interferência’). As ‘substâncias de interferência’ podem ser proteínas, carboidratos e/ou lípidos que se podem misturar com o desinfectante e reduzir a concentração de moléculas disponíveis para interagir com as bactérias. As bactérias sobreviventes são contabilizadas num meio contendo um agente “quenching” para neutralizar o desinfectante testado e permitir distinguir as bactérias cujo crescimento foi inibido das bactérias que foram mortas (Espigares, Bueno, Fernández-Crehuet, & Espigares, 2003).

A Norma Europeia EN 1040 é um dos protocolos elaborados pelo CEN e que se baseia num método de suspensão quantitativa. O método foi especialmente desenvolvido para avaliar a actividade bactericida básica de desinfectantes químicos e antisépticos e descreve toda a metodologia e requisitos necessários para a elaboração do teste.

Como tal, o presente trabalho baseou-se na Norma Europeia EN 1040 para implementar um método que permita avaliar a eficácia de desinfectantes químicos usados na indústria alimentar.

II. Objectivos

Pretendeu-se, com este trabalho experimental, implementar um método para avaliar a actividade bactericida de desinfectantes químicos, no Laboratório de Microbiologia dos Alimentos do INSA, I.P., baseado na Norma Europeia EN 1040.

Como tal, os principais objectivos deste trabalho foram: desenvolver e optimizar um método rápido e eficaz para determinar a densidade celular de diferentes bactérias; testar diferentes neutralizantes e avaliar o seu possível efeito tóxico para as bactérias testadas e o seu efeito neutralizante, para cada tipo de desinfectante testado; avaliar se o método de diluição-neutralização usando suspensões quantitativas bacterianas é um método sensível, reprodutível e adequado para avaliar a actividade bactericida de desinfectantes químicos.

Pretendeu-se, ainda, verificar se as condições experimentais do laboratório de microbiologia do INSA, I.P. são as indicadas para a realização de testes bactericidas em desinfectantes químicos usados na indústria alimentar.

III. Material e Métodos

Requisitos

O produto deve demonstrar, pelo menos, uma redução de 5 lg quando testado de acordo com o descrito na norma EN1040.

A actividade bactericida deve ser avaliada usando, pelo menos, as seguintes condições experimentais:

- Bactérias teste: *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*;
- Temperatura: 20 °C;
- Tempo de contacto: 5 minutos.

Princípio do método

Uma amostra do detergente/desinfetante, tal qual como fornecido (concentração máxima = 80%) e/ou diluído em água, é adicionado a uma suspensão bacteriana teste. A mistura é mantida a 20 ± 1 °C durante 5 min $\pm$ 10 s (condições teste obrigatórias). No final do tempo de contacto, é retirada uma alíquota; a actividade bactericida e/ou bacteriostática nesta porção é imediatamente neutralizada pelo método de diluição-neutralização. O número de bactérias sobreviventes em cada amostra é determinado e a redução bacteriana é calculada.



Fig. 7: Bancada de trabalho no laboratório de microbiologia do INSA, I.P.

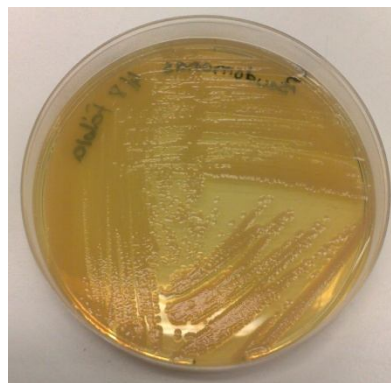
Material e Reagentes

Bactérias Teste

Foram usadas as seguintes estirpes obrigatórias: *Staphylococcus aureus* NCTC 10788, *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662 e as seguintes estirpes adicionais: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* NCTC 775, *Salmonella* Typhimurium NCTC 74 e *Listeria monocytogenes* NCTC 11994 (fig. 8).



S. aureus



P. aeruginosa



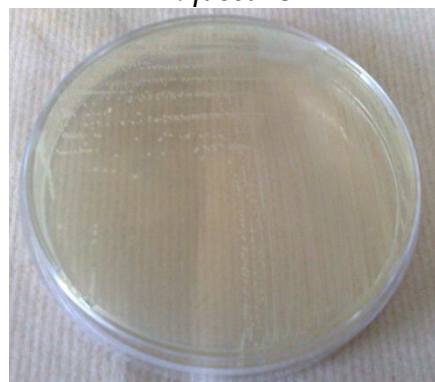
E. coli



E. faecalis



S. Typhimurium



L. monocytogenes

Fig. 8: Culturas bacterianas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. faecalis*, *Salmonella* Typhimurium e *L. monocytogenes* em meio sólido TSA ou PFC-A.

Temperatura de Incubação

A temperatura de incubação utilizada para os bactérias teste foi 37 ± 1 °C.

Foi usada a mesma temperatura para todas as incubações realizadas durante o teste, assim como nos controlos e validação.

Meios de cultura

Foram utilizados dois meios de cultura comerciais:

Meio PCA-F (*Plate Count Agar*), lote 840337801, Exp: 2011/08/11

Meio TSA (*Tryptone Soya Agar*), lote 51820, Exp: 2011/10/02



Fig. 9: Meio de cultura TSA.

Reagentes

Água. Foi utilizada água destilada por agulhas em todos os testes.

Diluidor. Utilizou-se solução de triptona cloreto de sódio como diluidor em todos os testes.

Neutralizantes. Os quatro neutralizantes testados foram designados por A (A₁,A₂,A₃,A₄), B, C e D e encontram-se esquematizados na tabela III.



Fig. 10: Água por agulhas e alguns dos neutralizantes testados.

Tabela III: Esquema dos vários neutralizantes testados e respectiva composição química.

Composição	Neutralizante						
	A				B	C	D
	A ₁	A ₂	A ₃	A ₄			
Tampão Fosfato	0,25 mol/l	0,15 mol/l	0,1 mol/l	0,05 mol/l			
Gema de Ovo					5 %		
Tween 80						30 g/l	
L- Histidina						1 g/l	
Tiosulfato de Sódio							5 g/l

Os neutralizantes foram preparados da seguinte forma:

Neutralizante **A**: 34g (A₁), 20g (A₂), 14g (A₃) e 7g (A₄) de hidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄); 500 ml água. Ajustou-se o pH (7,2 ± 0,2) com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/l e perfez-se com água até 1000 ml;

Neutralizante **B**: 5 ml de gema de ovo fresco em frasco volumétrico; perfez-se com água até 100ml;

Neutralizante **C**: 30g de Tween 80 (polisorbato 80); 1g de L-Histidina; 500 ml água. Ajustou-se o pH (7,2 ± 0,2) com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/l e perfez-se com água até 1 000 ml;

Neutralizante **D**: 5g de tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃); 500 ml água. Ajustou-se o pH (7,2 ± 0,2) com hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol/l e perfez-se com água até 1 000 ml.

Todos os neutralizantes foram esterilizados no autoclave pelo método de calor húmido.

Material de vidro

Todo o material em contacto com o meio de cultura, reagentes ou com o material a ensaiar foi previamente esterilizado.

Equipamento

- Foi utilizado o autoclave ($121 \pm 3^\circ\text{C}$ durante 15 min);
- Foram utilizados dois banhos: um banho termoestatizado a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ e outro banho termoestatizado a $45 \pm 1^\circ\text{C}$;



Fig. 11: Banho termoestatizado a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ onde se efectuaram os testes e banho termoestatizado a $45 \pm 1^\circ\text{C}$ para manter derretidos os meios de cultura.

- Densimat (bioMérieux);



Fig. 12: Aparelho densimat (biomérieux) utilizado para medir a densidade de células bacterianas.

- Estufa, mantida a 37 ± 1 °C;
- Medidor de pH, com uma precisão de calibração não superior a ± 0.1 unidades de pH a 20 ± 1 °C;
- Cronómetro;
- Agitador tipo vórtex;
- Frigorífico, mantido a uma temperatura de 2 - 8 °C;
- Pipetas graduadas, com capacidades nominais de 10 ml, 1 ml e 0,1 ml;
- Placas de petri;
- Esferas de vidro com 3 - 4 mm de diâmetro;
- Frascos volumétricos;



Fig.13: Estufa mantida a 37°C para incubação.

1- Preparação das Suspensões dos Bactérias Teste e Preparação das Soluções Teste

Para cada organismo teste foram preparadas duas suspensões diferentes: a “suspensão teste” para efectuar o teste e a “suspensão de validação” para efectuar os controlos e a validação do método.

2- Conservação e stock de culturas dos bactérias teste

Os bactérias teste foram crescidos em meio líquido BHI e incubados durante 18-24h a 37°C. Após esse tempo de incubação, cada organismo foi passado, em triplicado, para tubos de TSA com rampa e incubados durante 18-24h a 37°C.

Os tubos contendo os bactérias teste foram armazenados no frigorífico.



Fig. 14: Tubos contendo meio líquido BHI usados para o crescimento das bactérias.

3- Cultura de trabalho dos bactérias teste

Para se obter a cultura de trabalho dos bactérias teste, preparou-se primeiro uma subcultura a partir do stock, espalhando em placas de TSA e incubando. Após 18h - 24h, preparou-se uma segunda subcultura a partir da primeira subcultura, da mesma forma e incubando 18h - 24h. A partir da segunda subcultura, preparou-se uma terceira subcultura da mesma forma. A segunda e (quando possível) a terceira subculturas foram as culturas de trabalho.

4- Suspensões Teste (N)

a) Colocou-se 10 ml do diluidor num frasco de 100 ml com 5 g de esferas de vidro. Transferiu-se uma ansa de células da cultura de trabalho para o diluidor. As células foram suspensas no diluidor, friccionando a ansa contra a parede do frasco para libertar as células antes de as imergir no diluidor. Agitou-se o frasco durante 3 minutos usando um agitador tipo vórtex. Transferiu-se a suspensão (sem as esferas de vidro) para outro tubo.

b) Ajustou-se o número de células na suspensão até um valor dentro do intervalo 1.5×10^8 cfu/ml a 5×10^8 cfu/ml, usando o diluidor e estimando o número de cfu. Colocou-se a suspensão teste no banho termoeletrizado a 20°C.

c) Para a contagem prepararam-se diluições de 10^{-6} e 10^{-7} das suspensões teste, usando o diluidor. Agitou-se. Retirou-se uma amostra de 1.0 ml de cada diluição em duplicado e inoculou-se usando a

técnica de sementeira por incorporação (*pour plate technique*), transferindo cada 1 ml de amostra em caixas de petri separadas e adicionando 15 a 20 ml de TSA fundido a $45 \pm 1^\circ \text{C}$.

Incubou-se e efectuou-se a contagem (de acordo com a alínea 10).

5- Suspensão de Validação (“Nv”)

a) Para preparar a suspensão de validação, diluiu-se a suspensão teste com o diluidor até obter um valor entre $3.0 \times 10^2 \text{ cfu/ml}$ e $1.6 \times 10^3 \text{ cfu/ml}$ (cerca de $\frac{1}{4}$ (1+3) da diluição 10^{-5}).

b) Para a contagem, preparou-se uma diluição de 10^{-1} com o diluidor. Misturou-se. Retirou-se uma amostra de 1.0 ml em duplicado e inoculou-se usando a técnica de sementeira por incorporação (*pour plate technique*).

Incubou-se e efectuou-se a contagem (de acordo com a alínea 10).

6- Soluções Teste do Desinfectante

As soluções teste do produto foram preparadas com água destilada, num mínimo de três concentrações diferentes. O produto, tal qual como recebido, foi usado como uma das soluções teste do produto; neste caso, a concentração mais alta testada é 80%.

Como todos os produtos testados eram líquidos, foram preparadas diluições em água, volume/volume, usando frascos volumétricos.

As soluções teste do produto foram preparadas na hora e usadas num prazo máximo de 2h. Todas as soluções apresentavam uma homogeneidade física que permaneceu estável durante todo o procedimento.



Fig. 15: Soluções contendo alguns dos desinfetantes testados.

Foram testados quatro desinfetantes diferentes, designados por I, II, III e IV (tabela IV).

Tabela IV: Desinfetantes testados, respectivos princípios químicos bactericidas e soluções teste preparadas.

Desinfetante	Princípios químicos bactericidas do desinfetante	Soluções teste do desinfetante preparadas (%)
I	Tensioactivos aniónicos (> 5% mas < 15%)	100; 80 e 0,1
II	Alcalis inorgânicos	100; 1 e 0,1
III	Cloreto de benzalcónio (4%)	100; 2 e 0,1
IV	Hidrocloreto de biguanida polimérica	
	Álcool etoxilado	100, 1 e 0,1
	Cloreto de benzalcónio	

Procedimentos para obter a Actividade Bactericida do Produto

7 - Condições experimentais

A temperatura utilizada em todos os testes foi a temperatura obrigatória da norma EN1040, ou seja, 20 ± 1 °C.

O tempo de contacto utilizado em todos os testes foi o tempo de contacto obrigatório da norma EN1040, ou seja, 5 minutos $\pm$ 5 segundos.

8 - Calibração da temperatura

Antes de se efectuarem os testes, termoestabilizaram-se todos os reagentes (soluções teste do produto, suspensão teste, suspensão de validação, diluidor, água) à temperatura teste, 20 ± 1 °C, usando o banho termoestabilizado.

9 - Método de diluição-neutralização

Os procedimentos teste, de controlo e de validação foram realizados ao mesmo tempo. As representações gráficas respectivas encontram-se no anexo C.

9.1 - Teste “Na” – determinação das concentrações bactericidas

a) Pipetou-se 1.0 ml de água para o tubo. Adicionou-se 1.0 ml da suspensão teste. Iniciou-se o cronómetro imediatamente, misturou-se e colocou-se o tubo no banho termoestatizado a 20°C, durante $2 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$. No final deste tempo, adicionaram-se 8.0ml de uma das soluções teste do produto. Reiniciou-se o cronómetro no início da adição. Misturou-se e colocou-se o tubo no banho durante $5 \text{ min} \pm 5\text{s}$. Misturou-se novamente, imediatamente antes do final do tempo de contacto.

b) No final do tempo de contacto, retirou-se uma amostra de 1.0 ml da mistura teste “Na” e transferiu-se para o tubo contendo 8.0 ml de neutralizante e 1.0 ml de água. Misturou-se e colocou-se no banho.

Após o tempo de neutralização de $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$, retirou-se imediatamente uma amostra de 1.0 ml da mistura teste “Na” neutralizada (contendo o neutralizante, a solução teste do produto e a suspensão teste) em duplicado e inoculou-se usando a técnica de sementeira por incorporação (*pour plate technique*). Para tal, transferiu-se cada 1 ml de amostra em caixas de petri separadas e adicionar 15 a 20 ml de TSA fundido a $45 \pm 1^\circ\text{C}$.

Incubou-se e efectuou-se a contagem (de acordo com a alínea 10).

c) Efectuou-se o procedimento a) e b) usando as restantes soluções teste do produto, ao mesmo tempo.

d) Efectuou-se o procedimento a) a c), testando os bactérias teste adicionais.

9.2 - Controlo das condições experimentais “A” (Validação das condições experimentais seleccionadas e/ou verificação da ausência de efeitos letais nas condições do teste)

Para validar as condições experimentais seleccionadas e/ou verificar a ausência de qualquer efeito letal nas condições de teste, o procedimento deverá ser o seguinte:

Nota: quando o teste é efectuado nas seguintes condições: *S. aureus* ou *P. aeruginosa*, 20 °C, 5 minutos de tempo de contacto, este controlo foi ignorado.

- a) Pipetar 1.0 ml de água para o tubo. Adicionar 1.0 ml da suspensão teste. Iniciar o cronómetro imediatamente, misturar e colocar o tubo no banho termoelestatizado à temperatura 20°C durante 2 min ± 10 s.
- b) No final do tempo de contacto t, retirar uma amostra de 1.0 ml da mistura “A” em duplicado e inocular usando a técnica “verter em placa” ou “espalhar em placa”.
- c) Incubou-se e efectuaram-se as contagens (de acordo com a alínea 10).

9.3 - Controlo do Neutralizante “B” (Verificação da ausência de toxicidade do neutralizante)

- a) Pipetaram-se 8.0 ml do neutralizante – usado no teste – e 1.0 ml de água para o tubo. Adicionou-se 1.0 ml da suspensão de validação. Iniciou-se o cronómetro no início da adição, misturando e colocando o tubo no banho termoelestatizado a 20 ± 1 °C durante 5 min ± 10 s. Misturou-se, imediatamente antes do final do tempo;
- b) No final do tempo, retirou-se uma amostra de 1.0 ml desta mistura “B” em duplicado e inoculou-se, recorrendo à técnica de sementeira por incorporação;
- c) Incubou-se e efectuaram-se as contagens (de acordo com a alínea 10).

9.4 - Método de validação C (Validação da diluição-neutralização)

- a) Pipetou-se 1.0 ml da água para o tubo. Adicionou-se 1.0 ml do diluidor e, iniciando o cronómetro, adicionaram-se 8.0 ml da solução teste do produto na concentração mais elevada usada no teste. Agitou-se e colocou-se o tubo no banho. Agitou-se novamente, imediatamente antes de terminar o tempo de contacto;
- b) No final dos $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$, transferiu-se 1.0 ml da mistura para um tubo contendo 8.0 ml de neutralizante. Iniciou-se o cronómetro imediatamente, agitou-se e colocou-se o tubo no banho a $20 \pm 1^\circ\text{C}$ durante $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$;
- c) Iniciou-se o cronómetro ao adicionar 1.0 ml da suspensão teste e agitou-se. Colocou-se o tubo no banho durante $30 \pm 1 \text{ min}$. Agitou-se o tubo, imediatamente antes do final do tempo. No final do tempo, retirou-se uma amostra de 1.0 ml da mistura C, em duplicado, e inoculou-se usando a técnica de sementeira por incorporação;
- d) Incubou-se e efectuaram-se as contagens (de acordo com a alínea 10).

10 - Incubação e Contagem das Misturas Teste e das Misturas Controlo e de Validação

- a) Incubaram-se as placas de petri durante 20-24h. Anularam-se as placas que não podiam ser contadas, por qualquer razão. Efectuou-se a contagem das placas e registou-se o número cfu. Incubaram-se as placas durante 20-24h adicionais. Não se contaram as placas que já não apresentam colónias bem separadas. Recontaram-se as placas restantes.
- b) Anotou-se, para cada placa, o número exacto de colónias mas registou-se “> 330” para qualquer contagem acima de 330. Determinaram-se os valores V_c (de acordo com a alínea 11).
- c) Calculou-se o número de cfu/ml da Suspensão Teste N , da Suspensão de Validação N_v , da mistura teste N_a e das misturas de validação B e C .

Cálculo dos dados experimentais

Primeiro determinaram-se os valores V_c , seguidamente calcularam-se N , N_0 , Na , Nv , Nv_0 , A , B e C . Por fim, calculou-se a redução R .

11 - Determinação dos valores V_c

Os limites para a contagem de bactérias em placas de agar são 15 e 300 (limite mínimo e máximo, respectivamente). De acordo com a norma EN1040, o desvio aceitável é 10%, portanto, o limite mínimo de contagem considerado foi 14 e o limite máximo foi 330.

Quando a contagem de uma placa foi superior a 330, registou-se o número como “>330”. Quando o valor V_c foi inferior a 14, registou-se o número da contagem mas substituiu-se por “<14” para futuros cálculos (no caso do Na).

12 - Cálculo do N e N_0

N é o número de células por ml na suspensão teste. Após validação de duas diluições da suspensão teste, calculou-se o número de cfu/ml como média ponderada das contagens, usando a seguinte equação:

$$N = \frac{C}{(n_1 + 0,1 n_2)10^{-6}}$$

onde,

C é o somatório dos valores das contagens V_c ;

n_1 é o número dos valores das contagens V_c da menor diluição, i.e. 10^{-6} ;

n_2 é o número dos valores das contagens V_c da maior diluição, i.e. 10^{-7} ;

10^{-6} é o factor de diluição correspondente à menor diluição.

Arredondaram-se os resultados a dois algarismos significativos. Como resultado, o número de cfu/ml será expresso num valor numérico entre 1.0 e 9.9 multiplicado pelo expoente de base 10 apropriado.

13 - Cálculo de N_a

N_a é o número de sobreviventes por ml na mistura teste no final do tempo de contacto e antes da neutralização. É dez vezes superior ao valor V_c , devido à adição do neutralizante e da água.

Calculou-se N_a usando a seguinte fórmula:

$$N_a = \frac{10c}{n}$$

onde,

c é o somatório dos valores da contagem V_c ;

n é o número de valores da contagem V_c .

14 - Cálculo de N_v e N_{v_0}

N_v é o número de células por ml na suspensão de validação. É dez vezes mais que as contagens dos valores V_c devido ao passo de diluição de 10^{-1} .

N_{v_0} é o número de células por ml nas misturas B e C no início do tempo de contacto (tempo 0). É um décimo (1/10) da média ponderada dos valores V_c do N_v .

Equações para o cálculo de N_v e N_{v_0} :

$$N_v = \frac{10c}{n}$$

$$N_{v_0} = \frac{c}{n}$$

onde,

c é o somatório dos valores da contagem V_c ;

n é o número de valores da contagem V_c .

15 - Cálculo de A, B e C

Calculou-se A, B e C usando a seguinte equação:

$$A, B, C = \frac{c}{n}$$

onde,

c é o somatório dos valores da contagem V_c ;

n é o número de valores da contagem V_c .

16 - Cálculo da redução

A redução bacteriana ($R = N_0/N_a$) é expressa em lg.

Para cada bactéria, registou-se o número de cfu/ml na suspensão teste N e no teste N_a e calculou-se N_0 .

Para cada concentração de produto e condição experimental, calculou-se e registou-se a redução logaritmica decimal (lg), separadamente, usando a equação:

$$\lg R = \lg N_0 - \lg N_a$$

IV. Resultados

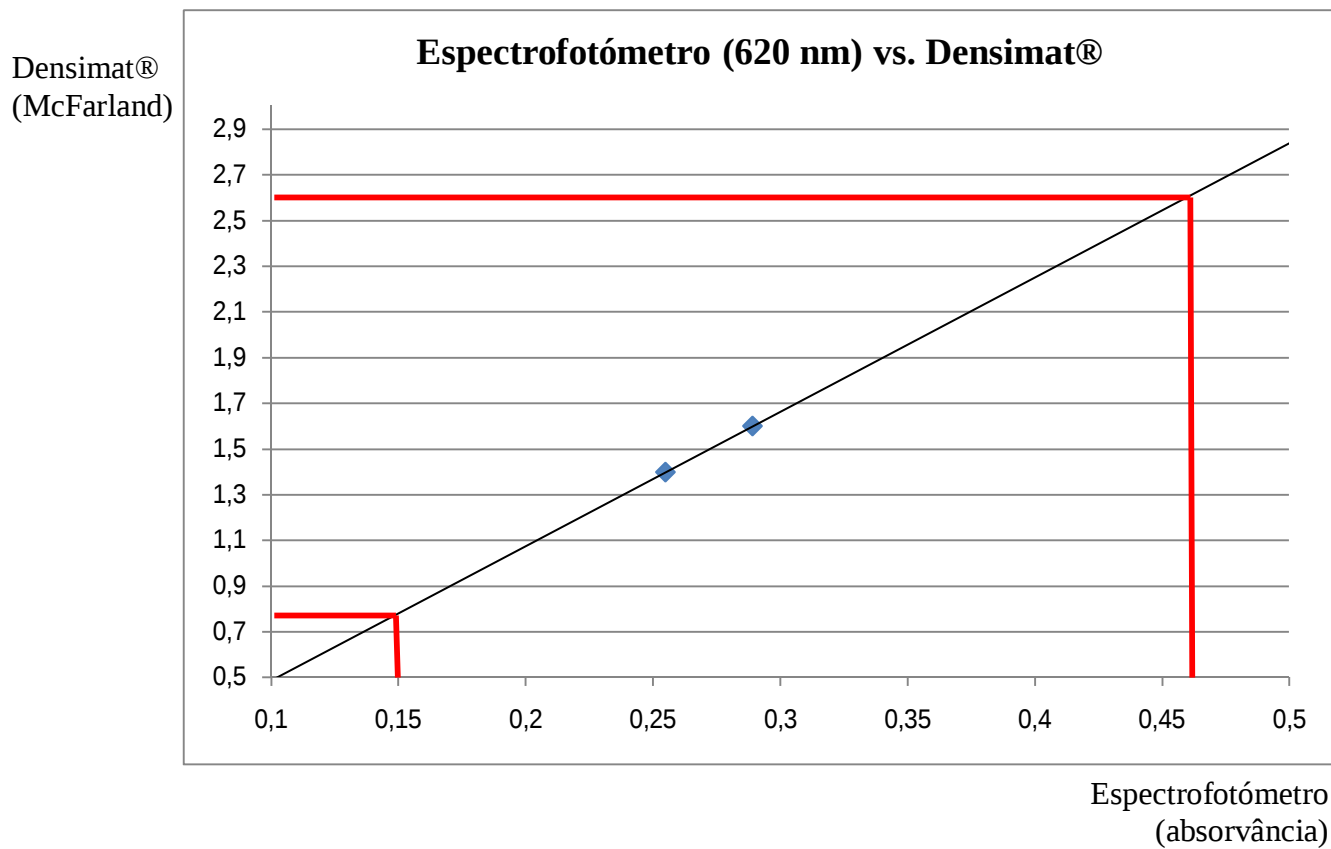


Fig. 16: Correlação entre as leituras do espectrofotômetro medidas a um comprimento de onda de 620 nm e as leituras do aparelho densimat (bioMérieux).

TESTE I

Desinfetante: I

Meio: PCA-F

Neutralizante: A₁, B, C e D

❖ *Staphylococcus aureus* RM/6571B/288-08

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)		
V_{C1}	95	$\bar{x} = 80$
V_{C2}	65	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não		

Controlo do neutralizante (B)		
$V_{C \text{ Neut.D}}$	6	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não
$V_{C \text{ Neut.A1}}$	9	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não
$V_{C \text{ Neut. C}}$	13	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não
$V_{C \text{ Neut. B}}$	5	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não

Validação do método (C)				
Neut. D	V _{C1}	0	$\bar{x} = 0$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de N _{v0} ? ☐ sim ☒ não
	V _{C2}	0		
Neut. A ₁	V _{C1}	0	$\bar{x} = 0$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de N _{v0} ? ☐ sim ☒ não
	V _{C2}	0		
Neut. C	V _{C1}	14	$\bar{x} = 10$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de N _{v0} ? ☐ sim ☒ não
	V _{C2}	5		
Neut. B	V _{C1}	0	$\bar{x} = 0$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de N _{v0} ? ☐ sim ☒ não
	V _{C2}	0		

Suspensão teste

Suspensão-teste (N e N ₀)	N	V _{C1}	V _{C2}	$\bar{x}_{wm} = > 330 \times 10^6$, lg N= 8,52
	10 ⁻⁶	> 330	> 330	N ₀ = N/10 ; lg N ₀ = 7,52
	10 ⁻⁷	48	35	7,17 ≤ lg N ₀ ≤ 7,70 ? ☒ sim ☐ não

TESTE I (cont.)

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)		
V_{C_1}	77	$\bar{x} = 78$
V_{C_2}	78	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160 \text{ ?}$ ☒ sim ☐ não		

Controlo do neutralizante (B)		
$V_{C \text{ Neut.D}}$	10	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0 \text{ ?}$ ☐ sim ☒ não
$V_{C \text{ Neut.A1}}$	2	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0 \text{ ?}$ ☐ sim ☒ não
$V_{C \text{ Neut. C}}$	6	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0 \text{ ?}$ ☐ sim ☒ não
$V_{C \text{ Neut. B}}$	9	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0 \text{ ?}$ ☐ sim ☒ não

Validação do método (C)				
<i>Neut. D</i>	V_{C1}	> 330	$\bar{x} = > 330$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de N_{v0} ? ☒ sim ☐ não
	V_{C2}	> 330		
<i>Neut. A_I</i>	V_{C1}	> 330	$\bar{x} = > 330$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de N_{v0} ? ☒ sim ☐ não
	V_{C2}	> 330		
<i>Neut. C</i>	V_{C1}	> 330	$\bar{x} = > 330$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de N_{v0} ? ☒ sim ☐ não
	V_{C2}	> 330		
<i>Neut. B</i>	V_{C1}	> 330	$\bar{x} = > 330$	$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5 \times \bar{x}$ de N_{v0} ? ☒ sim ☐ não
	V_{C2}	> 330		

Suspensão teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}_{wm} = 245 \times 10^6$, $\lg N = 8,39$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,39$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	244	246	
	10^{-7}	29	21	

TESTE II

Desinfectante: I

Meio: PCA-F

Neutralizante: C

❖ *Staphylococcus aureus* RM/6571B/288-08

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	60	$\bar{x} = 57$	V_{C1}	5	$\bar{x} = 5$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$ > 330
V_{C2}	54		V_{C2}	4		V_{C2}	> 330	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}_{wm} = 198 \times 10^6$, $\lg N = 8,30$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,30$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	189	207	
	10^{-7}	16	20	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,30$)	Tempo de contacto (min)
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,78	5 min
0,80	35	36	360	2,56	4,74	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,15	5 min

TESTE III

Desinfetante: I

Meio: PCA-F

Neutralizante: A₂

❖ *Staphylococcus aureus* RM/6571B/288-08

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	60	$\bar{x} = 58$	V_{C1}	9	$\bar{x} = 12$	V_{C1}	28	$\bar{x} = 14$
V_{C2}	55		V_{C2}	14		V_{C2}	0	
30 ≤ $\bar{x}$ de Nv_0 ≤ 160 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N ₀)	N	V _{C1}	V _{C2}	$\bar{x}$ wm = 246 x 10 ⁶ , lg N = 8,39 N ₀ = N/10 ; lg N ₀ = 7,39 7,17 ≤ lg N ₀ ≤ 7,70 ? ☒ sim ☐ não
	10 ⁻⁶	255	236	
	10 ⁻⁷	28	21	

Conc. do produto (%)	V _{C1}	V _{C2}	Na = $\bar{x}$ x 10	lgNa	lgR (lgN ₀ = 7,39)	Tempo de contacto (min)
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,87	5 min
0,80	0	0	< 140	< 2,15	> 5,24	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,24	5 min

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
Vc_1	60	$\bar{x} = 53$	Vc_1	16	$\bar{x} = 14$	Vc_1	> 330	$\bar{x} =$ > 330
Vc_2	46		Vc_2	12		Vc_2	> 330	
30 ≤ $\bar{x}$ de Nv_0 ≤ 160 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N ₀)	N	V _{C1}	V _{C2}	$\bar{x}$ wm = 221 x 10 ⁶ , lg N = 8,34 N ₀ = N/10 ; lg N ₀ = 7,34 7,17 ≤ lg N ₀ ≤ 7,70 ? ☒ sim ☐ não
	10 ⁻⁶	227	214	
	10 ⁻⁷	28	24	

Conc. do produto (%)	V _{C1}	V _{C2}	Na = $\bar{x}$ x 10	lgNa	lgR (lgN ₀ = 7,34)	Tempo de contacto (min)
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,87	5 min
0,80	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,87	5 min
1,00	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,87	5 min

TESTE IV

Desinfetante: I

Meio: PCA-F

Neutralizante: B

❖ *Staphylococcus aureus* RM/6571B/288-08

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	9	$\bar{x} = 6$	V_{C1}	0	$\bar{x} = 1$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$ > 330
V_{C2}	2		V_{C2}	1		V_{C2}	> 330	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 124 \times 10^{-6}$, $\lg N = 8,09$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,09$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☐ sim ☒ não
	10^{-6}	115	132	
	10^{-7}	13	18	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,09$)	Tempo de contacto (min)
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,57	5 min
0,80	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,57	5 min
1,00	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,57	5 min

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	72	$\bar{x} = 62$	V_{C1}	7	$\bar{x} = 8$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$ > 330
V_{C2}	51		V_{C2}	8		V_{C2}	> 330	
30 ≤ $\bar{x}$ de Nv_0 ≤ 160 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 248 \times 10^{-6}$, $\lg N = 8,39$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,39$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	253	242	
	10^{-7}	41	31	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,39$)	Tempo de contacto (min)
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,57	5 min
0,80	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,57	5 min
1,00	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,57	5 min

TESTE V

Desinfetante: I

Meio: TSA

Neutralizante: C

❖ *Staphylococcus aureus* NCTC 10788

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	36	$\bar{x} = 39$	V_{C1}	6	$\bar{x} = 5$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$ > 330
V_{C2}	41		V_{C2}	3		V_{C2}	> 330	
30 ≤ $\bar{x}$ de Nv_0 ≤ 160 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$ wm = 224×10^6 , lg N = 8,35
	10^{-6}	247	201	$N_0 = N/10$; lg N_0 = 7,35
	10^{-7}	28	31	$7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	lgNa	lgR (lg N_0 = 7,35)	Tempo de contacto (min)
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,83	5 min
0,80	13	10	120	2,08	5,27	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,20	5 min

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	49	$\bar{x} =$ 42	V_{C1}	2	$\bar{x} =$ 4	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$ > 330
V_{C2}	35		V_{C2}	5		V_{C2}	> 330	
30 ≤ $\bar{x}$ de Nv_0 ≤ 160 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$ wm = 233×10^6 , lg N = 8,37
	10^{-6}	239	226	$N_0 = N/10$; lg N_0 = 7,37
	10^{-7}	24	22	$7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	lgNa	lgR (lg N_0 = 7,37)	Tempo de contacto (min)
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,85	5 min
0,80	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,85	5 min
1,00	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,85	5 min

TESTE V (cont.)

❖ *Escherichia coli* ATCC 25922

Validação e controlos

Suspensão de validação (N_{v0})			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	25	$\bar{x} =$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$	V_{C1}	3	$\bar{x} =$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$
V_{C2}	25	25	V_{C2}	> 330	> 330	V_{C2}	2	3	V_{C2}	> 330	> 330
$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160?$ ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de A é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}?$ ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de B é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}?$ ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de C é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}?$ ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = > 268 \times 10^6$, $\lg N = > 8,43$
	10^{-6}	> 330	206	$N_0 = N/10$; $\lg N_0 = > 7,43$
	10^{-7}	21	12	$7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,71$)	Tempo de contacto (min)
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 4,19	5 min
0,80	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 4,19	5 min
1,00	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 4,19	5 min

❖ *Salmonella* Typhimurium

Validação e controlos

Suspensão de validação (N_{v0})			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	29	$\bar{x} = 29$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$	V_{C1}	3	$\bar{x} =$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$
V_{C2}	28		V_{C2}	> 330	> 330	V_{C2}	2	3	V_{C2}	> 330	> 330
$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160?$ ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de A é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}?$ ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de B é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}?$ ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de C é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}?$ ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 149 \times 10^6$, $\lg N = 8,17$
	10^{-6}	146	152	$N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,17$
	10^{-7}	18	20	$7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,17$)	Tempo de contacto (min)
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,65	5 min
0,80	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,65	5 min
1,00	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,65	5 min

TESTE V (cont.)

❖ *Enterococcus faecalis* NCTC 775

Validação e controlos

Suspensão de validação (N_{v0})			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	26	$\bar{x} =$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$	V_{C1}	3	$\bar{x} =$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$
V_{C2}	17	22	V_{C2}	> 330	> 330	V_{C2}	1	2	V_{C2}	> 330	> 330
$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } A \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 87 \times 10^6$, $\lg N = 7,94$
	10^{-6}	77	97	$N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 6,94$
	10^{-7}	11	9	$7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☐ sim ☒ não

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 6,94$)	Tempo de contacto (min)
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,42	5 min
0,80	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,42	5 min
1,00	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,42	5 min

❖ *Listeria monocytogenes* NCTC 11994

Validação e controlos

Suspensão de validação (N_{v0})			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	65	$\bar{x} =$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$	V_{C1}	4	$\bar{x} =$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$
V_{C2}	52	59	V_{C2}	> 330	> 330	V_{C2}	7	6	V_{C2}	> 330	> 330
$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } A \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 317 \times 10^6$, $\lg N = 8,50$
	10^{-6}	306	328	$N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,50$
	10^{-7}	31	29	$7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,50$)	Tempo de contacto (min)
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,98	5 min
0,80	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,98	5 min
1,00	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,98	5 min

TESTE VI

Desinfectante: I

Meio: PCA-F

Neutralizante: C

❖ *Staphylococcus aureus* NCTC 10788

Validação e controlos

Suspensão de validação (N_{v0})				
$1/3$ de 10^{-5}	VC_1	71	$\bar{x} = 81$	$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160$? ☒ sim ☐ não
	VC_2	91		
$2/5$ de 10^{-5}	VC_1	85	$\bar{x} = 95$	$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160$? ☒ sim ☐ não
	VC_2	104		
$1/2$ de 10^{-5}	VC_1	83	$\bar{x} = 97$	$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160$? ☒ sim ☐ não
	VC_2	110		

Controlo do neutralizante (B)				
$1/3$ de 10^{-5}	VC_1	5	$\bar{x} = 4$	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não
	VC_2	3		
$2/5$ de 10^{-5}	VC_1	8	$\bar{x} = 8$	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não
	VC_2	7		
$1/2$ de 10^{-5}	VC_1	12	$\bar{x} = 11$	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não
	VC_2	9		

Suspensão teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	VC_1	VC_2	$\bar{x} \text{ wm} = 157 \times 10^6$, $\lg N = 8,20$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,20$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	157	156	
	10^{-7}	14	27	

TESTE VI (cont.)

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controlos

Suspensão de validação (N_{v0})				
$1/3$ de 10^{-5}	V_{C1}	64	$\bar{x} = 56$	$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160 ?$ ☒ sim ☐ não
	V_{C2}	48		
$2/5$ de 10^{-5}	V_{C1}	64	$\bar{x} = 71$	$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160 ?$ ☒ sim ☐ não
	V_{C2}	78		
$1/2$ de 10^{-5}	V_{C1}	78	$\bar{x} = 183$	$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160 ?$ ☐ sim ☒ não
	V_{C2}	105		

Controlo do neutralizante (B)				
$1/3$ de 10^{-5}	V_{C1}	11	$\bar{x} = 8$	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0} ?$ ☐ sim ☒ não
	V_{C2}	5		
$2/5$ de 10^{-5}	V_{C1}	10	$\bar{x} = 8$	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0} ?$ ☐ sim ☒ não
	V_{C2}	5		
$1/2$ de 10^{-5}	V_{C1}	4	$\bar{x} = 7$	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0} ?$ ☐ sim ☒ não
	V_{C2}	9		

Suspensão teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 171 \times 10^6, \lg N = 8,23$ $N_0 = N/10 ; \lg N_0 = 7,23$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70 ?$ ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	172	170	
	10^{-7}	16	26	

TESTE VII

Desinfectante: II

Meio: PCA-F

Neutralizante: A₁, D

❖ *Staphylococcus aureus* RM/6571B/288-08

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)		
V_{C1}	32	$\bar{x} = 34$	V_{C1}	3	$\bar{x} = 3$
V_{C2}	35		V_{C2}	3	
30 ≤ $\bar{x}$ de Nv_0 ≤ 160 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não		

Validação do método (C)							
Neut. D	V _{C1}	> 330	$\bar{x}$ = > 330	Neut. A ₁	V _{C1}	> 330	$\bar{x}$ = > 330
	V _{C2}	> 330			V _{C2}	> 330	
$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de Nv ₀ ? ☒ sim ☐ não				$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de Nv ₀ ? ☒ sim ☐ não			

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 152 \times 10^6$, $\lg N = 8,18$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,18$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	162	141	
	10^{-7}	18	12	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na =$ $\bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,18$)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,66	5 min
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,66	5 min
1,00	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,66	5 min

TESTE VII (cont.)

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)		
V_{C1}	53	$\bar{x} = 70$	V_{C1}	5	$\bar{x} = 7$
V_{C2}	87		V_{C2}	9	
30 ≤ $\bar{x}$ de Nv_0 ≤ 160 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não		

Validação do método (C)							
Neut. D	Vc ₁	0	$\bar{x} = 0$	Neut. A ₁	Vc ₁	> 330	$\bar{x} =$ > 330
	Vc ₂	0			Vc ₂	> 330	
$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de Nv ₀ ? ☐ sim ☒ não				$\bar{x}$ de C é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de Nv ₀ ? ☒ sim ☐ não			

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 275 \times 10^6$, $\lg N = 8,44$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,44$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	273	277	
	10^{-7}	31	29	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,44$)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,92	5 min
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,92	5 min
1,00	0	1	< 140	< 2,15	> 5,29	5 min

TESTE VIII

Desinfetante: II

Meio: TSA

Neutralizante: A₁

❖ *Staphylococcus aureus* RM/6571B/288-08

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	75	$\bar{x} = 80$	V_{C1}	11	$\bar{x} = 10$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$
V_{C2}	84		V_{C2}	9		V_{C2}	> 330	> 330
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N ₀)	N	V _{C1}	V _{C2}	$\bar{x}$ wm = > 322 x 10 ⁶ , lg N = 8,51 N ₀ = N/10 ; lg N ₀ = 7,51 7,17 ≤ lg N ₀ ≤ 7,70 ? ☒ sim ☐ não
	10 ⁻⁶	> 330	314	
	10 ⁻⁷	26	40	

Conc. do produto (%)	V _{C1}	V _{C2}	Na = $\bar{x}$ x 10	lgNa	lgR (lgN ₀ = 7,51)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,99	5 min
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,99	5 min
1,00	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,99	5 min

❖ *Staphylococcus aureus* NCTC 10788

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
Vc_1	62	$\bar{x} = 60$	Vc_1	4	$\bar{x} = 4$	Vc_1	> 330	$\bar{x} =$
Vc_2	57		Vc_2	3		Vc_2	> 330	> 330
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N ₀)	N	V _{C1}	V _{C2}	$\bar{x}$ wm = 277 x 10 ⁶ , lg N = 8,44 N ₀ = N/10 ; lg N ₀ = 7,44 7,17 ≤ lg N ₀ ≤ 7,70 ? ☒ sim ☐ não
	10 ⁻⁶	294	259	
	10 ⁻⁷	15	33	

Conc. do produto (%)	V _{C1}	V _{C2}	Na = $\bar{x}$ x 10	lgNa	lgR (lgN ₀ =7,44)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,92	5 min
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,92	5 min
1,00	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,92	5 min

TESTE IX

Desinfectante: II

Meio: TSA

Neutralizante: A₁

❖ *Escherichia coli* ATCC 25922

Validação e controlos

Suspensão de validação (N _{v0})			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V _{C1}	73	$\bar{x} =$	V _{C1}	> 330	$\bar{x} =$	V _{C1}	6	$\bar{x} =$	V _{C1}	> 330	$\bar{x} =$
V _{C2}	109	91	V _{C2}	> 330	> 330	V _{C2}	7	7	V _{C2}	> 330	> 330
30 ≤ $\bar{x}$ de N _{v0} ≤ 160 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de A é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de N _{v0} ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de N _{v0} ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de N _{v0} ? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N ₀)	N	V _{C1}	V _{C2}	$\bar{x}$ wm = > 330 x 10 ⁶ , lg N = 8,52
	10 ⁻⁶	> 330	> 330	N ₀ = N/10 ; lg N ₀ = 7,52
	10 ⁻⁷	16	35	7,17 ≤ lg N ₀ ≤ 7,70 ? ☒ sim ☐ não

Conc. do produto (%)	V _{C1}	V _{C2}	Na = $\bar{x}$ x 10	lgNa	lgR (lgN ₀ =7,52)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 4,00	5 min
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 4,00	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,37	5 min

❖ *Salmonella* Typhimurium

Validação e controlos

Suspensão de validação (N _{v0})			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V _{C1}	143	$\bar{x} =$	V _{C1}	> 330	$\bar{x} =$	V _{C1}	10	$\bar{x} =$	V _{C1}	> 330	$\bar{x} =$
V _{C2}	219	181	V _{C2}	> 330	> 330	V _{C2}	20	15	V _{C2}	> 330	> 330
30 ≤ $\bar{x}$ de N _{v0} ≤ 160 ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de A é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de N _{v0} ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de N _{v0} ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de N _{v0} ? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N ₀)	N	V _{C1}	V _{C2}	$\bar{x}$ wm = > 330 x 10 ⁶ , lg N = 8,52
	10 ⁻⁶	> 330	> 330	N ₀ = N/10 ; lg N ₀ = 7,52
	10 ⁻⁷	29	30	7,17 ≤ lg N ₀ ≤ 7,70 ? ☒ sim ☐ não

Conc. do produto (%)	V _{C1}	V _{C2}	Na = $\bar{x}$ x 10	lgNa	lgR (lgN ₀ =7,52)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 4,00	5 min
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 4,00	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,37	5 min

TESTE IX (cont.)

❖ *Enterococcus faecalis* NCTC 775

Validação e controlos

Suspensão de validação (N_{v0})			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	59	$\bar{x} =$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$	V_{C1}	6	$\bar{x} = 6$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$
V_{C2}	82	71	V_{C2}	> 330	> 330	V_{C2}	6		V_{C2}	> 330	> 330
$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de A é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de B é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de C é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 195 \times 10^6$, $\lg N = 8,29$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,29$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	201	188	
	10^{-7}	14	17	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,29$)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,77	5 min
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,77	5 min
1,00	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,77	5 min

❖ *Listeria monocytogenes* NCTC 11994

Validação e controlos

Suspensão de validação (N_{v0})			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	191	$\bar{x} =$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$	V_{C1}	22	$\bar{x} =$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$
V_{C2}	185	188	V_{C2}	> 330	> 330	V_{C2}	26	24	V_{C2}	> 330	> 330
$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de A é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de B é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de C é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = > 330 \times 10^6$, $\lg N = 8,52$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,52$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	> 330	> 330	
	10^{-7}	61	80	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,52$)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 4,00	5 min
0,01	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 4,00	5 min
1,00	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 4,00	5 min

TESTE X

Desinfetante: III

Meio: TSA

Neutralizante: D, B

❖ *Staphylococcus aureus* NCTC 10788

Validação e controlos

Suspensão de validação (N_{v0})					
V_{C1}	66	$\bar{x} = 72$			
V_{C2}	77				
$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160$? ☒ sim ☐ não					
Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
<i>Neut.</i> D	6	$\bar{x} \text{ de } B \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não	<i>Neut.</i> D	0	$\bar{x} \text{ de } C \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não
<i>Neut.</i> B	14	$\bar{x} \text{ de } B \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não	<i>Neut.</i> B	0	$\bar{x} \text{ de } C \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não

Suspensão teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	$w_m = >330 \times 10^6$, $\lg N = 8,52$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,52$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	> 330	
	10^{-7}	19	

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controlos

Suspensão de validação (N_{v0})					
V_{C1}	21	$\bar{x} = 19$			
V_{C2}	16				
$30 \leq \bar{x} \text{ de } N_{v0} \leq 160$? ☐ sim ☒ não					
Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
<i>Neut.</i> D	2	$\bar{x} \text{ de } B \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não	<i>Neut.</i> D	0	$\bar{x} \text{ de } C \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não
<i>Neut.</i> B	4	$\bar{x} \text{ de } B \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não	<i>Neut.</i> B	0	$\bar{x} \text{ de } C \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não

Suspensão teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	$w_m = 68 \times 10^6$, $\lg N = 7,83$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 6,83$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☐ sim ☒ não
	10^{-6}	68	
	10^{-7}	2	

TESTE X (cont.)

❖ *Escherichia coli* ATCC 25922

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)		
V_{C_1}	52	$\bar{x} = 30$
V_{C_2}	7	
$30 \leq \bar{x}$ de $Nv_0 \leq 160$?		
☒ sim ☐ não		

Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
Neut. D	2	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não	Neut. D	0	$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não
Neut. B	7	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não	Neut. B	0	$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não

Suspensão teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	$w_m = 152 \times 10^6$, $\lg N = 8,18$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,18$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	152	
	10^{-7}	11	

❖ *Salmonella* Typhimurium

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)		
V_{C_1}	67	$\bar{x} = 67$
V_{C_2}	67	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não		

Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
Neut. D	4	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não	Neut. D	0	$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não
Neut. B	140	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☒ sim ☐ não	Neut. B	0	$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não

Suspensão teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	$w_m = 241 \times 10^6$, $\lg N = 8,38$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,38$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	241	
	10^{-7}	20	

TESTE X (cont.)

❖ *Enterococcus faecalis* NCTC 775

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)		
V_{C_1}	35	$\bar{x} = 29$
V_{C_2}	22	
$30 \leq \bar{x}$ de $Nv_0 \leq 160$? ☐ sim ☒ não		

Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
<i>Neut.</i> <i>D</i>	2	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não	<i>Neut.</i> <i>D</i>	0	$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não
<i>Neut.</i> <i>B</i>	2	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☐ sim ☒ não	<i>Neut.</i> <i>B</i>	31	$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } N_{v0}$? ☒ sim ☐ não

Suspensão teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	$w_m = 120 \times 10^6$, $\lg N = 8,08$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,08$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☐ sim ☒ não
	10^{-6}	120	
	10^{-7}	8	

TESTE XI

Desinfetante: III

Meio: TSA

Neutralizante: C

❖ *Staphylococcus aureus* NCTC 10788

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C_1}	90	$\bar{x} = 90$	V_{C_1}	8	$\bar{x} = 8$	V_{C_1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C_2}	90		V_{C_2}	8		V_{C_2}	0	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 269 \times 10^6$, $\lg N = 8,43$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,43$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	265	272	
	10^{-7}	30	38	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,43$)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,91	5 min
0,02	0	0	< 140	< 2,15	> 5,28	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,28	5 min

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C_1}	39	$\bar{x} = 48$	V_{C_1}	4	$\bar{x} = 5$	V_{C_1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C_2}	57		V_{C_2}	5		V_{C_2}	0	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 161 \times 10^6$, $\lg N = 8,21$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,21$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	168	154	
	10^{-7}	9	26	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,21$)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,69	5 min
0,02	0	0	< 140	< 2,15	> 5,06	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,06	5 min

TESTE XI (cont.)

❖ *Escherichia coli* ATCC 25922

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C_1}	0	$\bar{x} = 0$	V_{C_1}	> 330	$\bar{x} = > 330$	V_{C_1}	0	$\bar{x} = 0$	V_{C_1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C_2}	0		V_{C_2}	> 330		V_{C_2}	0		V_{C_2}	0	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160 \text{ ?}$ ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de A } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0 \text{ ?}$ ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de B } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0 \text{ ?}$ ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de C } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0 \text{ ?}$ ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 165 \times 10^6$, $\lg N = 8,22$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,22$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	163	167	
	10^{-7}	10	17	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,22$)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,70	5 min
0,02	0	0	< 140	< 2,15	> 5,07	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,07	5 min

❖ *Salmonella* Typhimurium

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	41	$\bar{x} =$ 50	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$ > 330	V_{C1}	6	$\bar{x} = 7$	V_{C1}	1	$\bar{x} = 1$
V_{C2}	59		V_{C2}	> 330		V_{C2}	8		V_{C2}	1	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } A \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 243 \times 10^6$, $\lg N = 8,39$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,39$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	220	266	
	10^{-7}	22	30	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,39$)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,87	5 min
0,02	0	0	< 140	< 2,15	> 5,24	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,24	5 min

TESTE XI (cont.)

❖ *Enterococcus faecalis* NCTC 775

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	21	$\bar{x} = 23$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} = > 330$	V_{C1}	1	$\bar{x} = 2$	V_{C1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C2}	25		V_{C2}	> 330		V_{C2}	2		V_{C2}	0	
30 ≤ $\bar{x}$ de Nv_0 ≤ 160 ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de A é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 102 \times 10^6$, $\lg N = 8,01$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,01$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☐ sim ☒ não
	10^{-6}	100	104	
	10^{-7}	13	17	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na =$ $\bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,01$)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,49	5 min
0,02	2	5	< 140	< 2,15	> 4,86	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 4,86	5 min

TESTE XII

Desinfetante: III

Meio: PCA-F

Neutralizante: A₁

❖ *Staphylococcus aureus* RM/6571B/288-08

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	26	$\bar{x} = 39$	V_{C1}	1	$\bar{x} = 2$	V_{C1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C2}	52		V_{C2}	2		V_{C2}	0	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N ₀)	N	V _{C1}	V _{C2}	$\bar{x}$ wm = 113 x 10 ⁶ , lg N = 8,05
	10 ⁻⁶	115	111	N ₀ = N/10 ; lg N ₀ = 7,05
	10 ⁻⁷	18	11	7,17 ≤ lg N ₀ ≤ 7,70 ? ☐ sim ☒ não

Conc. do produto (%)	V _{C1}	V _{C2}	Na = $\bar{x}$ x 10	lgNa	lgR (lgN ₀ =7,05)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,53	5 min
0,05	0	0	< 140	< 2,15	> 4,90	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 4,90	5 min

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
Vc_1	43	$\bar{x} = 46$	Vc_1	7	$\bar{x} = 6$	Vc_1	0	$\bar{x} = 0$
Vc_2	49		Vc_2	5		Vc_2	0	
30 ≤ $\bar{x}$ de Nv_0 ≤ 160 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N ₀)	N	V _{C1}	V _{C2}	$\bar{x}$ wm = 203 x 10 ⁶ , lg N = 8,31
	10 ⁻⁶	214	191	N ₀ = N/10 ; lg N ₀ = 7,31
	10 ⁻⁷	23	17	7,17 ≤ lg N ₀ ≤ 7,70 ? ☒ sim ☐ não

Conc. do produto (%)	V _{C1}	V _{C2}	Na = $\bar{x}$ x 10	lgNa	lgR (lgN ₀ =7,31)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,79	5 min
0,05	0	0	< 140	< 2,15	> 5,16	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,16	5 min

TESTE XIII

Desinfetante: III

Meio: TSA

Neutralizante: A₁

❖ *Staphylococcus aureus* NCTC 10788

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	58	$\bar{x} = 64$	V_{C1}	4	$\bar{x} = 4$	V_{C1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C2}	69		V_{C2}	4		V_{C2}	0	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N ₀)	N	V _{C1}	V _{C2}	$\bar{x}$ wm = 251 x 10 ⁶ , lg N = 8,40
	10 ⁻⁶	248	253	N ₀ = N/10 ; lg N ₀ = 7,40
	10 ⁻⁷	31	27	7,17 ≤ lg N ₀ ≤ 7,70 ? ☒ sim ☐ não

Conc. do produto (%)	V _{C1}	V _{C2}	Na = $\bar{x}$ x 10	lgNa	lgR (N ₀ =7,40)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,88	5 min
0,02	0	0	< 140	< 2,15	> 5,25	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,25	5 min

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	39	$\bar{x} = 39$	V_{C1}	2	$\bar{x} = 4$	V_{C1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C2}	38		V_{C2}	6		V_{C2}	0	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N ₀)	N	V _{C1}	V _{C2}	$\bar{x}$ wm = 130 x 10 ⁶ , lg N = 8,11
	10 ⁻⁶	125	135	N ₀ = N/10 ; lg N ₀ = 7,11
	10 ⁻⁷	8	15	7,17 ≤ lg N ₀ ≤ 7,70 ? ☐ sim ☒ não

Conc. do produto (%)	V _{C1}	V _{C2}	Na = $\bar{x}$ x 10	lgNa	lgR (lgN ₀ = 7,11)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,59	5 min
0,02	0	0	< 140	< 2,15	> 4,96	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 4,96	5 min

TESTE XIII (cont.)

❖ *Escherichia coli* ATCC 25922

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	71	$\bar{x} = 77$	V_{C1}	> 330	$\bar{x} =$ > 330	V_{C1}	9	$\bar{x} = 6$	V_{C1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C2}	82		V_{C2}	> 330		V_{C2}	3		V_{C2}	0	
30 ≤ $\bar{x}$ de Nv_0 ≤ 160? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de A é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$ wm = 269×10^6 , lg N = 8,43 $N_0 = N/10$; lg N_0 = 7,43 $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	257	281	
	10^{-7}	28	12	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	lg Na	lg R (lg N_0 = 7,43)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,91	5 min
0,02	0	0	< 140	< 2,15	> 5,28	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,28	5 min

❖ *Salmonella* Typhimurium

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C_1}	79	$\bar{x} = 74$	V_{C_1}	> 330	$\bar{x} = > 330$	V_{C_1}	2	$\bar{x} = 4$	V_{C_1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C_2}	69		V_{C_2}	> 330		V_{C_2}	6		V_{C_2}	0	
30 ≤ $\bar{x}$ de Nv_0 ≤ 160? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de A é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$ wm = 264×10^6 , lg N = 8,42 $N_0 = N/10$; lg N_0 = 7,42 $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	263	264	
	10^{-7}	32	31	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	lg Na	lg R (N_0 = 7,42)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,90	5 min
0,02	0	0	< 140	< 2,15	> 5,27	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,27	5 min

TESTE XIV

Desinfetante: III

Meio: TSA

Neutralizante: A₁

❖ *Staphylococcus aureus* NCTC 10788

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	82	$\bar{x} = 90$	V_{C1}	6	$\bar{x} = 6$	V_{C1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C2}	98		V_{C2}	5		V_{C2}	0	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = > 330 \times 10^6$, $\lg N = 8,52$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,52$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	> 330	> 330	
	10^{-7}	28	38	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,52$)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 4,0	5 min
0,02	0	0	< 140	< 2,15	> 5,37	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,37	5 min

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	69	$\bar{x} = 71$	V_{C1}	9	$\bar{x} = 10$	V_{C1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C2}	73		V_{C2}	10		V_{C2}	0	
30 ≤ $\bar{x}$ de Nv_0 ≤ 160 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 234 \times 10^6$, $\lg N = 8,37$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,37$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	248	219	
	10^{-7}	27	25	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,37$)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,85	5 min
0,02	24	5	150	2,18	5,19	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,22	5 min

TESTE XIV (cont.)

❖ *Escherichia coli* ATCC 25922

Validação e controlos

Suspensão de validação (N_{v0})			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C_1}	33	$\bar{x} = 37$	V_{C_1}	> 330	$\bar{x} = > 330$	V_{C_1}	3	$\bar{x} = 3$	V_{C_1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C_2}	41		V_{C_2}	> 330		V_{C_2}	3		V_{C_2}	0	
30 ≤ $\bar{x}$ de N_{v0} ≤ 160 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de N_{v0} ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de N_{v0} ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de N_{v0} ? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 178 \times 10^6$, $\lg N = 8,25$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,25$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	188	167	
	10^{-7}	15	17	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,25$)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,73	5 min
0,02	20	54	370	2,57	4,68	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,10	5 min

❖ *Salmonella* Typhimurium

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo das cond. experimentais (A)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C_1}	70	$\bar{x} = 71$	V_{C_1}	> 330	$\bar{x} = > 330$	V_{C_1}	5	$\bar{x} = 7$	V_{C_1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C_2}	71		V_{C_2}	> 330		V_{C_2}	8		V_{C_2}	0	
30 ≤ $\bar{x}$ de Nv_0 ≤ 160? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 256 \times 10^6$, $\lg N = 8,41$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,41$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	231	280	
	10^{-7}	25	29	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,41$)	Tempo de contacto (min)
0,001	> 330	> 330	> 3300	> 3,52	< 3,89	5 min
0,02	0	0	< 140	< 2,15	> 5,26	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,26	5 min

TESTE XV

Desinfetante: IV

Meio: PCA-F

Neutralizante: A₁

❖ *Staphylococcus aureus* RM/6571B/288-08

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C_1}	91	$\bar{x} = 82$	V_{C_1}	14	$\bar{x} = 14$	V_{C_1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C_2}	73		V_{C_2}	13		V_{C_2}	0	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 229 \times 10^6$, $\lg N = 8,36$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,36$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	248	210	
	10^{-7}	23	22	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,36$)	Tempo de contacto (min)
0,001	0	0	< 140	< 2,15	> 5,21	5 min
0,01	0	0	< 140	< 2,15	> 5,21	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,21	5 min

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)			Validação do método (C)		
V_{C1}	32	$\bar{x} = 37$	V_{C1}	2	$\bar{x} = 3$	V_{C1}	0	$\bar{x} = 0$
V_{C2}	42		V_{C2}	3		V_{C2}	0	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não			$\bar{x} \text{ de } C \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não		

Suspensão teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x} \text{ wm} = 137 \times 10^6$, $\lg N = 8,14$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,14$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☐ sim ☒ não
	10^{-6}	127	146	
	10^{-7}	17	13	

TESTE XVI

Desinfectante: IV

Meio: PCA-F

Neutralizantes: D, A₁, C

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nv_0)		
V_{C_1}	71	$\bar{x} = 69$
V_{C_2}	67	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160 \text{ ?}$ ☒ sim ☐ não		

Controlo do neutralizante (B)				
$Neut.D$	V_{C_1}	4	$\bar{x} = 5$	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0?$ ☐ sim ☒ não
	V_{C_2}	5		
$Neut.A_1$	V_{C_1}	3	$\bar{x} = 6$	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0?$ ☐ sim ☒ não
	V_{C_2}	8		
$Neut.C$	V_{C_1}	25	$\bar{x} = 16$	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0?$ ☐ sim ☒ não
	V_{C_2}	6		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e N_0)	N	V_{C1}	V_{C2}	$\bar{x}$ wm = 206×10^6 , $\lg N = 8,31$ $N_0 = N/10$; $\lg N_0 = 7,31$ $7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$? ☒ sim ☐ não
	10^{-6}	205	206	
	10^{-7}	24	23	

Conc. do produto (%)	V_{C1}	V_{C2}	$Na = \bar{x} \times 10$	$\lg Na$	$\lg R$ ($\lg N_0 = 7,31$)	Tempo de contacto (min)
0,001	0	0	< 140	< 2,15	> 5,16	5 min
0,01	0	0	< 140	< 2,15	> 5,16	5 min
1,00	0	0	< 140	< 2,15	> 5,16	5 min

TESTE XVII

Desinfetante: IV

Meio: PCA-F

Neutralizante: A₂, A₃, A₄, B

❖ *Staphylococcus aureus* RM/6571B/288-08

Validação e controles

Suspensão de validação (Nv_0)			Controlo do neutralizante (B)				
Vc_1	103	$\bar{x} = 95$	$Neut. A_2$	Vc_1	17	$\bar{x} = 13$	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não
				Vc_2	9		
Vc_2	87		$Neut. A_3$	Vc_1	6	$\bar{x} = 7$	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não
				Vc_2	8		
$30 \leq \bar{x}$ de $Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não			$Neut. A_4$	Vc_1	14	$\bar{x} = 15$	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não
				Vc_2	15		
		$Neut. B$	Vc_1	12	$\bar{x} = 12$	$\bar{x}$ de B é $\geq 0,5$ x $\bar{x}$ de Nv_0 ? ☐ sim ☒ não	
			Vc_2	12			

Suspensão teste

Suspensão-teste (N e N ₀)	N	Vc ₁	Vc ₂	$\bar{x}$ wm = $> 330 \times 10^6$, lg N = 8,52
	10 ⁻⁶	> 330	> 330	N ₀ = N/10 ; lg N ₀ = 7,52
	10 ⁻⁷	40	37	7,17 $\leq$ lg N ₀ $\leq$ 7,70 ? ☒ sim ☐ não

❖ *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 10662

Validação e controles

Suspensão de validação (Nv_0)		
Vc_1	43	$Neut.$ A_3
Vc_2	53	
$30 \leq \bar{x} \text{ de } Nv_0 \leq 160$? ☒ sim ☐ não		

Controlo do neutralizante (B)				
$Neut.$ A_2	Vc_1	10	$\bar{x} = 8$	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não
	Vc_2	5		
$Neut.$ A_3	Vc_1	8	$\bar{x} = 10$	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não
	Vc_2	11		
$Neut.$ A_4	Vc_1	14	$\bar{x} = 10$	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não
	Vc_2	5		
$Neut.$ B	Vc_1	7	$\bar{x} = 9$	$\bar{x} \text{ de } B \text{ é } \geq 0,5 \times \bar{x} \text{ de } Nv_0$? ☐ sim ☒ não
	Vc_2	4		

Suspensão teste

Suspensão-teste (N e N ₀)	N	Vc ₁	Vc ₂	$\bar{x}$ wm = 215×10^6 , lg N = 8,33
	10 ⁻⁶	220	210	N ₀ = N/10 ; lg N ₀ = 7,33
	10 ⁻⁷	26	30	7,17 $\leq$ lg N ₀ $\leq$ 7,70 ? ☒ sim ☐ não

V. DISCUSSÃO

A norma EN1040 faz referência a dois métodos para neutralizar o efeito bactericida da mistura do desinfectante com a suspensão bacteriana teste no final do tempo de contacto: o método de diluição-neutralização e o método de filtração por membrana. De acordo com esta norma, o método de eleição é o diluição-neutralização e, portanto, foi este o escolhido para realizar todos os testes.

A validação do método diluição-neutralização pressupõe que se encontre um neutralizante adequado para cada desinfectante a testar. Como tal, foram preparados quatro neutralizantes diferentes (A, B, C e D) e testados com quatro desinfectantes distintos (I, II, III e IV). A validação do método é dada pelo controlo C que consiste em adicionar o desinfectante ao neutralizante durante 5 minutos e, no final desse tempo de contacto, adicionar a suspensão bacteriana (durante 30 minutos). Se o neutralizante for o adequado para o desinfectante, este último será neutralizado e, como tal, espera-se que o efeito bactericida do desinfectante seja reduzido. Assim, quando os valores de contagem (V_c) do controlo C são superiores a 0,5 vezes os valores V_c da suspensão de validação (N_{v0}), o método é validado. Os resultados obtidos para cada neutralizante e desinfectante estão descritos nas tabelas “Validação do método (C)” dos Resultados.

Com o objectivo de verificar se o neutralizante é tóxico para a bactéria a testar, é necessário efectuar o controlo B. Este controlo consiste em adicionar a suspensão de validação bacteriana ao neutralizante durante 5 minutos. Quando os valores de contagem (V_c) são superiores a 0,5 vezes os valores V_c da suspensão de validação (N_{v0}) significa que o neutralizante não é tóxico para a bactéria e, portanto, o controlo B é validado. Os resultados obtidos para os diferentes neutralizantes estão descritos nas tabelas “controlo do neutralizante (B)” dos Resultados.

O controlo A permite controlar as condições experimentais do teste, para os casos em que se efectuam variações à norma, ou seja, quando se utilizam estirpes que não *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Se validado, este controlo permite verificar a ausência de efeitos letais nas condições do teste.

Todas as soluções teste de cada desinfectante foram preparadas com água destilada em três concentrações diferentes, de modo a incluir uma concentração no intervalo activo, uma concentração no intervalo não-activo e a concentração aconselhada pelo fabricante.

Tendo em conta que as soluções teste do desinfectante são diluídas 80% durante o método teste e de validação, a concentração teste desejada deverá ser 1.25 vezes maior.

De acordo com a norma EN1040, os valores de contagem das placas de petri possuem um limite inferior e superior. O limite inferior das contagens (14) é baseado no facto de que a variabilidade é maior quanto menor for o número da contagem, por amostra e, como tal, os cálculos daí resultantes podem levar a resultados errados. O limite superior das contagens (330) reflecte a imprecisão da contagem de colónias sobrepostas e a inibição de crescimento devido a subnutrição.

Segundo a norma EN1040, o teste bactericida deve ser feito usando obrigatoriamente as bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Porém, também podem ser testadas outras bactérias adicionais. Das bactérias adicionais sugeridas na norma, também se utilizou *Salmonella* Typhimurim, *E. coli* e *E. faecalis*. Para além destas quatro bactérias, também se achou importante testar a actividade dos desinfectantes contra *L. monocytogenes*, apesar de esta bactéria não ser mencionada na norma EN 1040. Esta adenda à norma parece bastante importante dado que *L. monocytogenes* tem sido causadora de inúmeros surtos alimentares graves nos últimos anos e, devido às suas características, consegue persistir num ambiente de processamento de alimentos durante longos períodos de tempo e ser resistente a muitos desinfectantes químicos.

O espectrofotómetro mede a intensidade da luz em função do comprimento de onda. Para tal, o aparelho compara quantitativamente uma fracção da luz que passa pela solução de referência e pela solução teste. Na prática, a intensidade da luz que atravessa a solução teste é medida e os valores de transmitância para um determinado comprimento de onda são comparados com os valores da solução de referência.

Na norma EN1040, o uso do espectrofotómetro para ajustar o número de células é altamente recomendado (620 nm de comprimento de onda – cuvete 10 mm de comprimento) e é mencionado que cada laboratório deve produzir os seus próprios dados de calibração, sabendo que os valores correctos de densidade óptica se encontram geralmente entre 0.150 e 0.460. Porém, outros métodos podem ser utilizados. Em termos práticos, a medição de valores espectrofotométricos, para cada ensaio, torna-se um processo demorado. Como tal, tentou-se encontrar uma alternativa para ajustar o número de células das bactérias teste. O Densimat (bioMérieux) é um fotómetro portátil, comum nos laboratórios de microbiologia e que possui uma boa correlação com as leituras do espectrofotómetro. Para além de ser fácil de usar, este aparelho possui uma boa correlação com a contagem de células e é um método reprodutível. Como tal, foi o método escolhido para ajustar o número de células das bactérias teste.

Os valores medidos no densimat® são dados numa escala de densidade MacFarland. Assim, prepararam-se duas suspensões bacterianas que foram lidas no Densimat® e no espectrofotómetro a um comprimento de onda de 620 nm.

Elaborou-se um gráfico com os valores de leitura obtidos em cada aparelho (fig.16), com o objectivo de se encontrar um intervalo de densidade óptica cujos valores de contagem de células sejam os correctos. Observando a figura 16, pode concluir-se que o intervalo de valores correcto de densidade óptica do espectrofotómetro (entre 0.150 e 0.460) corresponde ao intervalo de valores 0.8 a 2.6 no Densimat®. Como tal, este foi o intervalo usado em todos os testes para ajustar o número de células das bactérias teste no Densimat®.

De seguida, serão discutidos individualmente todos os testes efectuados.

Teste I

As suspensões de validação (N_{v0}) e teste (N) foram ambas validadas para as duas estirpes testadas, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. O que significa que o DENSIMAT® é um método rápido e eficaz para ajustar o número de células. Ao longo dos testes foram efectuadas inúmeras repetições para autenticar a reprodutibilidade do aparelho. Este parâmetro será discutido mais adiante.

Com este teste pretendeu-se avaliar, também, qual dos neutralizantes (A_1 , B, C ou D) seria o mais adequado para neutralizar o desinfectante I. Observando as tabelas “Controlo do neutralizante (B)”, verifica-se que os resultados obtidos para *S. aureus* e *P. aeruginosa* não foram validados. O teste foi repetido com o objectivo de se concluir se ocorreu algum erro por parte do operador ou se os neutralizantes são de facto, tóxicos, para as estirpes testadas.

Observando as tabelas “Validação do método (C)”, verifica-se que o método de diluição-neutralização é válido para *P. aeruginosa* utilizando qualquer um dos neutralizantes, porém, o mesmo não se verifica para *S. aureus*. Como tal, houve necessidade de se repetir o teste para *S. aureus* pois pode ter ocorrido alguma falha, como por exemplo, um erro de pipetagem.

Teste II

Efectuou-se o teste bactericida utilizando apenas *S. aureus*. As suspensões de validação (N_{v0}) e teste (N) foram ambas validadas, o que significa que o ajuste do número de células utilizando o DENSIMAT® continuou a revelar-se um método rápido, eficaz e reprodutível.

Neste teste utilizou-se apenas o neutralizante C, com o objectivo de estudar a sua capacidade de neutralizar o desinfectante I. Observando as tabelas “Validação do método (C)”, verifica-se que o método de diluição-neutralização foi validado. Conclui-se, portanto, que o neutralizante C é eficaz a neutralizar o efeito do desinfectante I. Assim, a não validação do método para *S. aureus* no teste I foi muito provavelmente um erro do operador.

Observando a tabela “Controlo do neutralizante (B)”, verifica-se que os resultados obtidos não foram validados. Assim, é possível que o neutralizante C seja, de facto, tóxico para *S. aureus* e, portanto, foi testado outro neutralizante (teste III).

Foram testadas três concentrações diferentes do desinfectante I: 1, 80 e 100%. De acordo com os resultados obtidos (“Teste”), apenas a concentração 100% se mostrou eficaz contra *S. aureus*, pois foi a única onde se verificou uma redução bacteriana superior a 5 lg. Ou seja, o desinfectante I deve ser usado sem efectuar qualquer diluição, pois isso iria comprometer a eficácia bactericida do produto. Apesar do teste preencher o requisito de possuir uma “concentração não activa” (1% e 80%), o controlo B não foi validado, o que significa que o teste não pode ser validado.

Teste III

Efectuou-se o teste bactericida utilizando *S. aureus* e *P. aeruginosa*. As suspensões de validação (N_{v0}) e teste (N) foram ambas validadas, o que significa que o ajuste do número de células utilizando o DENSIMAT® continuou a revelar-se um método rápido, eficaz e reprodutível.

Com este teste pretendeu-se avaliar se o neutralizante A seria o mais adequado para neutralizar o desinfectante I. Observando as tabelas “Validação do método (C)”, verifica-se que o método de diluição-neutralização foi validado para *P. aeruginosa* mas não para *S. aureus*. Conclui-se, portanto, que o neutralizante A não é o mais indicado para neutralizar o efeito do desinfectante I. Observando a tabela “Controlo do neutralizante (B)”, verifica-se que os resultados obtidos também não foram validados. Assim, conclui-se que o neutralizante A poderá ser tóxico para *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Desta forma, foi testado outro neutralizante (teste IV).

Foram utilizadas três concentrações diferentes do detergente loiça: 1, 80 e 100%. No caso de *S. aureus*, não se pode concluir nada em relação ao efeito bactericida do detergente, uma vez que o controlo C (“Validação do método”) não foi validado. No caso de *P. aeruginosa*, de acordo com os resultados obtidos (“Teste”), nenhuma concentração do detergente mostrou um efeito bactericida eficaz, pois a redução bacteriana foi inferior a 5 lg nos três testes.

Assim, apesar do teste preencher o requisito de possuir uma “concentração não activa” (1% e 80%), como o controlo B não foi validado, o teste também não é válido.

Teste IV

Efectuou-se o teste bactericida utilizando *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Para verificar a legitimidade do intervalo de valores de densidade estabelecido para o ajuste do número de células, efectuou-se uma suspensão bacteriana para *S. aureus* com um valor de densidade abaixo do valor mínimo. E, de facto, verificou-se que as suspensões de validação (N_{v0}) e teste (N) foram validadas para *P. aeruginosa* mas não para *S. aureus*. O que significa que, quando o valor de densidade não está no intervalo correcto, o ajuste do número de células não é o correcto.

Com este teste também se pretendeu avaliar se o neutralizante B seria adequado para neutralizar o desinfectante I. Observando as tabelas “Validação do método (C)”, verifica-se que o método de diluição-neutralização foi validado para ambas as estirpes. Conclui-se, portanto, que o neutralizante B é eficaz a neutralizar o efeito do desinfectante I.

Porém, observando a tabela “Controlo do neutralizante (B)”, verifica-se que os resultados obtidos não estão válidos e, portanto, o neutralizante B poderá ser tóxico para *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Foram testadas três concentrações diferentes do desinfectante I: 1, 80 e 100%. No caso de *S. aureus*, não se pode concluir nada em relação ao efeito bactericida do detergente, uma vez que as suspensões de validação (N_{v0}) e teste (N) não foram validadas. No caso de *P. aeruginosa*, de acordo com os resultados obtidos (‘Teste’), nenhuma concentração do detergente mostrou um efeito bactericida eficaz, pois a redução bacteriana foi inferior a 5 lg nos três testes. Este resultado está de acordo com o resultado obtido no teste III.

Assim, apesar do teste preencher o requisito de possuir uma “concentração não activa” (1% e 80%), como o controlo B não foi validado, o teste também não pode ser validado.

Teste V

Com este teste pretendeu-se testar a introdução de outras bactérias, nomeadamente *E. coli*, *S. Typhimurium*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes*. Para além disso, também se usou (em N , N_{v0} , A, B, C e ‘teste’) um novo meio de cultura, o meio TSA (*tryptone soya agar*), que é o meio de cultura obrigatório da Norma EN1040.

As suspensões teste (N) foram validadas para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *E. coli* e *L. monocytogenes* mas não para *E. faecalis*, o que significa que o Densimat® é um método que também pode ser utilizado para ajustar o número de células das novas estirpes testadas. No caso de *E. faecalis*, como esta é uma bactéria de crescimento fastidioso, não se conseguiu obter cultura suficiente para que a ‘suspensão-teste N ’ fosse validada, daí os baixos valores V_c obtidos. Como tal, os resultados obtidos no ‘teste’ não podem ser validados.

Nos testes futuros tentou cultivar-se a bactéria em duas placas TSA (em vez de uma) para que houvesse cultura suficiente para validar a ‘suspensão-teste *N*’.

As suspensões de validação (N_{v0}) não foram validadas para *S. Typhimurium*, *E. coli* e *E. faecalis*. Quanto a *E. faecalis*, é compreensível, uma vez que a suspensão teste ‘*N*’ (a partir de qual é preparada a suspensão de validação) também não foi validada. No caso de *S. Typhimurium* e *E. coli*, pode ter ocorrido um erro na preparação das ‘suspensões de validação’, onde provavelmente se usou um factor de diluição maior (na alínea a) do ponto “5- *Suspensão de Validação* (“*N_v”*)” dos métodos). Isto explicaria os baixos valores obtidos que não permitiram a sua validação.

Observando as tabelas “Controlo das condições experimentais (A)” e “Validação do método (C)”, verifica-se que o método de diluição-neutralização foi validado para todas as estirpes testadas. Conclui-se, portanto, que o neutralizante C é eficaz a neutralizar o efeito do desinfectante I e as condições experimentais são válidas para todas as estirpes testadas.

Verificou-se que o TSA é um bom meio de cultura, não só para as bactérias obrigatórias mencionadas na norma EN1040 (*S. aureus* e *P. aeruginosa*), como também para as bactérias adicionais testadas (*S. Typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *E. faecalis*).

Teste VI

Com este teste pretendeu-se verificar se a não validação do controlo B estaria relacionada com a preparação da Suspensão de Validação (N_v). Para tal, efectuaram-se alterações à alínea a) do ponto “5- *Suspensão de Validação* (“*N_v”*)” dos métodos, alterando o factor de diluição para $\frac{1}{3}$ (1+2) da diluição 10^{-5} , $\frac{2}{5}$ (1+1,5) da diluição 10^{-5} e $\frac{1}{2}$ (1+1) da diluição 10^{-5} .

Os resultados obtidos para *S. aureus* e *P. aeruginosa* foram semelhantes, ou seja, apesar das suspensões de validação (N_{v0}) e teste (*N*) terem sido ambas validadas (à excepção da diluição $\frac{1}{2}$ de *P. aeruginosa*), os valores obtidos no controlo B (‘controlo do neutralizante’) continuam a não ser válidos.

Teste VII

Com este teste pretendeu-se avaliar qual dos neutralizantes – A₁ ou D - seria o mais adequado para neutralizar o desinfectante II. Para tal efectuou-se o teste utilizando *S. aureus* e *P. aeruginosa*. As suspensões de validação (N_{v0}) e teste (*N*) foram validadas para ambas as estirpes o que significa, mais uma vez, que o DENSIMAT® é um método rápido, eficaz e reprodutível de ajustar o número de células.

Observando as tabelas “Validação do método (C)”, verifica-se que o método de diluição-neutralização foi validado para as duas estirpes quando se usou o neutralizante A₁ mas só foi validado para *S. aureus* quando se usou o neutralizante D. Conclui-se, portanto, que o neutralizante A₁ seria o mais eficaz a neutralizar o efeito do desinfectante II. .

Observando a tabela “Controlo do neutralizante (B)” verifica-se que os resultados obtidos não foram validados. Assim, conclui-se que o neutralizante D parece ser tóxico para *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Foram testadas três concentrações diferentes do desinfectante II: 0,1; 1 e 100%. No caso de *S. aureus*, nenhuma das concentrações do desinfectante revelou possuir um efeito bactericida, uma vez que a redução bacteriana foi inferior a 5 lg nos três testes. Em relação a *P. aeruginosa*, de acordo com os resultados obtidos (‘Teste’), apenas a concentração 100% do desinfectante mostrou um efeito bactericida eficaz, pois a redução bacteriana foi superior a 5 lg. Este teste permite concluir se a concentração do desinfectante aconselhada pelo fabricante é a ideal. Neste caso verificou-se que não. A concentração do desinfectante II terá que ser superior à aconselhada (> 1%), para que haja uma acção bactericida eficaz sobre as bactérias testadas.

Contudo, apesar do teste preencher o requisito de possuir uma “concentração não activa” (0,1%), como o controlo B não foi validado, o teste também não pode ser validado.

Teste VIII

Com este teste pretendeu-se avaliar qual dos neutralizantes A₁ seria o mais adequado para neutralizar o desinfectante II. Para tal efectuou-se o teste utilizando *S. aureus* RM/6571B/288-08 e *S. aureus* NCTC 10788. As suspensões de validação (N_{v0}) e teste (N) foram validadas para ambas as estirpes o que significa, mais uma vez, que o DENSIMAT® é um método rápido, eficaz e reprodutível de ajustar o número de células.

Observando as tabelas “Validação do método (C)”, verifica-se que o método de diluição-neutralização foi validado para as duas estirpes. Conclui-se, portanto, que o neutralizante A₁ seria o indicado para neutralizar o efeito do desinfectante II.

Observando a tabela “Controlo do neutralizante (B)” verifica-se que os resultados obtidos continuam a não ser validados.

Foram testadas três concentrações diferentes do desinfectante II: 0,1; 1 e 100%. Para ambas as estirpes, nenhuma das concentrações do desinfectante revelou possuir um efeito bactericida, uma vez que a redução bacteriana foi inferior a 5 lg nos três testes. Este teste permite concluir se a concentração do desinfectante aconselhada pelo fabricante é a ideal. Neste caso verificou-se que não, a concentração do desinfectante II terá que ser muito superior à aconselhada (> 1%), para que haja uma acção bactericida eficaz sobre as bactérias testadas.

Contudo, apesar do teste preencher o requisito de possuir uma “concentração não activa” (0,1%), como o controlo B não foi validado, o teste também não pode ser validado.

Também se verifica que os resultados obtidos para as duas estirpes foram muito semelhantes. Portanto, as conclusões tiradas para os testes em que se utilizou *S. aureus* RM/6571B/288-08 podem ser validadas, apesar de não ser esta a estirpe mencionada na Norma.

Teste IX

Com este teste pretendeu-se estudar a introdução de estirpes adicionais à norma, nomeadamente *E. coli*, *S. Typhimurium*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes*.

As suspensões teste (*N*) foram validadas para todas as estirpes, corroborando mais uma vez a eficácia, rapidez e reprodutibilidade do ajuste no número de células utilizando o Densimat®.

As suspensões de validação (*Nv₀*) foram validadas para *E. coli* e *E. faecalis* mas não para *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*. Isto deve-se provavelmente aos elevados valores *Vc* de '*N*' obtidos (que foram todos superiores a 330), fazendo com que os valores *Vc* de '*Nv₀*' fossem superiores ao limite máximo de validação.

Observando as tabelas “Controlo das condições experimentais (**A**)”, verifica-se que o controlo foi validado para todas as estirpes testadas. Conclui-se, portanto, que não existem efeitos letais nas condições do teste.

Observando as tabelas “Validação do método (**C**)”, verifica-se que o método de diluição-neutralização foi validado para todas as estirpes testadas. Conclui-se, portanto, que o neutralizante *A₁* é eficaz a neutralizar o efeito do desinfectante II, como foi demonstrado nos testes VII e VIII.

Porém, observando a tabela “Controlo do neutralizante (**B**)”, verifica-se que os resultados obtidos não foram validados. Assim, conclui-se que o neutralizante *A₁* parece ser tóxico para *E. coli*, *S. Typhimurium*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes*.

Foram testadas três concentrações diferentes do desinfectante II: 0,1%, 1% e 100%. No caso de *E. faecalis* e *L. monocytogenes*, nenhuma das concentrações do desinfectante testadas revelou possuir um efeito bactericida, uma vez que a redução bacteriana foi inferior a 5 lg nos três testes. Em relação a *E. coli*, *S. Typhimurium*, de acordo com os resultados obtidos ('Teste'), apenas a concentração 100% do detergente mostrou um efeito bactericida eficaz, pois a redução bacteriana foi superior a 5 lg. Assim, verificou-se que a concentração do desinfectante aconselhada pelo fabricante (1%) não é a ideal. A concentração terá que ser de 100% para que haja uma acção bactericida eficaz contra *E. coli*, *S. Typhimurium*.

Apesar do teste preencher o requisito de possuir uma “concentração não activa” (0,1%), não preenche o requisito do controlo B validado. Como tal, as conclusões retiradas do teste não são válidas.

Teste X

Com este teste pretendeu-se avaliar qual dos neutralizantes – B ou D - seria o mais adequado para neutralizar o desinfectante III. Para tal utilizaram-se *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. Typhimurium* e *E. faecalis*. Neste teste não foi possível efectuar duplicados, pelo que podem estar erros associados aos resultados obtidos.

As suspensões de validação (N_{v0}) e teste (N) foram validadas para *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium*. Observando as tabelas “Validação do método (C)” para estas três estirpes, verifica-se que o método de diluição-neutralização não foi validado para nenhum dos neutralizantes testados. Conclui-se, portanto, que os neutralizantes B e D não são eficazes a neutralizar o efeito do desinfectante III.

Teste XI

Com este teste pretendeu-se avaliar se o neutralizante C seria o mais adequado para neutralizar o desinfectante III. Para tal, efectuou-se o teste utilizando *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. Typhimurium* e *E. faecalis*.

Observando a tabela “Controlo das condições experimentais (A)”, verifica-se que os resultados foram validadas para todas as estirpes. Portanto, concluiu-se que não existem efeitos letais nas condições em que o teste foi realizado.

As suspensões de validação (N_{v0}) foram validadas para *S. aureus* e *S. Typhimurium*. Observando as tabelas “Validação do método (C)” para estas duas estirpes, verifica-se que o método de diluição-neutralização não foi validado. Conclui-se, portanto, que o neutralizante C também não é eficaz a neutralizar o efeito do desinfectante III.

Porém, observando a tabela “Controlo do neutralizante (B)”, verifica-se que os resultados obtidos não foram validados. Assim, conclui-se que o neutralizante A₁ parece ser tóxico para *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. Typhimurium* e *E. faecalis*.

Foram testadas três concentrações diferentes do desinfectante III: 0,1%, 2% e 100%.

A suspensão teste (N) foi validada apenas para três estirpes: *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium*. Os resultados obtidos no ‘teste’ para estas três estirpes mostram que este desinfectante possui um efeito bactericida eficaz na concentração 100% e na concentração 2% (a concentração aconselhada pelo fabricante). O teste também mostrou que, na concentração 0,1%, o desinfectante III não possui qualquer efeito bactericida, pois o valor da redução é inferior a 5 lg.

Apesar do teste preencher o requisito de possuir uma “concentração não activa” (0,1%), não preenche o requisito do controlo B validado. Como tal, as conclusões retiradas do teste não são válidas.

Teste XII

Com este teste pretendeu-se avaliar se o neutralizante A1 seria o mais adequado para neutralizar o desinfetante III. Para tal efectuou-se o teste utilizando *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

As suspensões de validação (N_{v0}) foram validadas para ambas as estirpes, como tal, as conclusões respeitantes ao controlo C são válidas. Assim, observando as tabelas “Validação do método (C)”, verifica-se que o método de diluição-neutralização não foi validado para ambas as estirpes, o que significa que o neutralizante A1 não é eficaz a neutralizar o desinfetante III.

Foram testadas três concentrações diferentes do desinfetante III: 0,1%, 5% e 100%. Porém, como ambos os controlos ('B' e 'C') não foram validados, nada se pode concluir acerca dos resultados obtidos no 'teste'.

Teste XIII

Neste teste usou-se um novo meio de cultura que vem descrito na norma EN1040, o meio TSA. Efectuou-se o teste utilizando *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. Typhimurium*.

Observando a tabela “Controlo das condições experimentais (A)”, verifica-se que os resultados foram validados para todas as estirpes. Portanto, concluiu-se que não existem efeitos letais nas condições em que o teste foi realizado.

As suspensões de validação (N_{v0}) foram validadas para todas as estirpes. Observando as tabelas “Validação do método (C)”, verifica-se que o método de diluição-neutralização não foi validado. Conclui-se, portanto, que o neutralizante C não é eficaz a neutralizar o efeito do desinfetante III, estando este resultado de acordo com os resultados obtidos no teste XI.

Foram testadas três concentrações diferentes do desinfetante III: 0,1%, 2% e 100%.

A suspensão teste (N) foi validada apenas para três estirpes: *S. aureus*, *E. coli* e *S. Typhimurium*. Os resultados obtidos no 'teste' para estas três estirpes mostram que este desinfetante possui um efeito bactericida eficaz na concentração 100% e na concentração 2% (a concentração aconselhada pelo fabricante). O teste também mostrou que, na concentração 0,1%, o desinfetante III não possui qualquer efeito bactericida, pois o valor da redução é inferior a 5 lg. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos no teste XI, mostrando que este método é reprodutível.

Apesar do teste preencher o requisito de possuir uma “concentração não activa” (0,1%), não preenche o requisito do controlo B validado. Como tal, as conclusões acerca do efeito bactericida do desinfetante testado não são válidas.

Teste XIV

Efectuou-se o teste utilizando *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. Typhimurium*.

Observando a tabela “Controlo das condições experimentais (A)”, verifica-se que os resultados foram validadas para todas as estirpes. Portanto, concluiu-se que não existem efeitos letais nas condições em que o teste foi realizado.

As suspensões de validação (N_{v0}) foram validadas para todas as estirpes. Observando as tabelas “Validação do método (C)” verifica-se que o método de diluição-neutralização não foi validado. Conclui-se, portanto, que o neutralizante C não é eficaz a neutralizar o efeito do desinfectante III, estando este resultado de acordo com os resultados obtidos nos testes IV e XIII.

Foram testadas três concentrações diferentes do desinfectante III: 0,1%, 2% e 100%.

A suspensão teste (N) foi validada para todas as estirpes. Como tal, o uso do Densimat® revelou-se um método reprodutível para ajustar o número de células das diversas estirpes usadas no teste.

Os resultados obtidos no ‘teste’ para *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *S. Typhimurium* mostram que o desinfectante III possui um efeito bactericida eficaz na concentração 100% e na concentração 2% (a concentração aconselhada pelo fabricante) e é ineficaz na concentração 0,1%. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos no teste IV, mostrando que este método possui uma boa reprodutibilidade de resultados.

Os resultados obtidos no ‘teste’ para *E. coli* mostram que o desinfectante III não possui qualquer efeito bactericida na concentração aconselhada pelo fabricante (nem na concentração 0,1%), mas possui efeito bactericida na concentração 100% pois o valor da redução é inferior a 5 lg.

Apesar do teste preencher o requisito de possuir uma “concentração não activa” (0,1%), os controlos B e C não foram validados. Como tal, as conclusões acerca do efeito bactericida do desinfectante testado não são válidas.

Teste XV

Com este teste pretendeu-se avaliar se o neutralizante A_1 seria o mais adequado para neutralizar o desinfectante IV. Para tal efectuou-se o teste utilizando *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

As suspensões de validação (N_{v0}) foram validadas para ambas as estirpes. Observando as tabelas “Validação do método (C)” para estas duas estirpes, verifica-se que o método de diluição-neutralização não foi validado. Conclui-se, portanto, que o neutralizante C não é eficaz a neutralizar o efeito do desinfectante IV.

Observando a tabela “Controlo do neutralizante (B)”, verifica-se que os resultados obtidos não foram validados. Assim, conclui-se que o neutralizante A_1 poderá ser tóxico para *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Foram testadas três concentrações diferentes do desinfectante IV: 0,1%, 1% e 100%.

A suspensão teste (N) foi validada apenas para *S. aureus*. O resultado obtido no ‘teste’ para esta estirpe mostra que este desinfectante possui um efeito bactericida eficaz nas três concentrações testadas (0,1%, 1% e 100%), pois o valor da redução foi superior a 5 lg. Porém, como o controlo B não foi validado, não se pode validar o resultado obtido no ‘teste’. Isto porque a redução bacteriana pode resultar do efeito do neutralizante (e não apenas do efeito bactericida do desinfectante), que pode ser tóxico para a estirpe testada.

Apesar do teste preencher o requisito de possuir uma “concentração não activa” (0,1%), os controlos B e C não foram validados. Como tal, as conclusões acerca do efeito bactericida do desinfectante testado não são válidas.

Teste XVI

Com este teste pretendeu-se avaliar qual dos neutralizantes - A₁, C e D - seria o mais adequado para neutralizar o desinfectante IV. Também se pretendeu validar a suspensão-teste (Nv) para *P. aeruginosa* (que não foi possível no teste XV).

Para tal efectuou-se o teste utilizando apenas *P. aeruginosa*. Observando os resultados obtidos verifica-se que as suspensões teste (Nv) e de validação (Nv₀) foram ambas validadas.

De acordo com os resultados da tabela “Controlo do neutralizante (B)”, verifica-se que os mesmos não foram validados. Assim, conclui-se que todos os neutralizantes parecem ser tóxicos para *P. aeruginosa*.

Foram testadas três concentrações diferentes do desinfectante IV: 0,1%, 1% e 100%. Apesar do resultado obtido no ‘teste’ para esta estirpe mostrar que este desinfectante possui um efeito bactericida eficaz nas três concentrações testadas (0,1%, 1% e 100%), este resultado não pode ser validado, uma vez que o controlo B não foi validado. Ou seja, a redução bacteriana verificada pode resultar também do efeito do neutralizante e não apenas do efeito bactericida do desinfectante.

Apesar do teste preencher o requisito de possuir uma “concentração não activa” (0,1%), o controlo B não foi validado. Como tal, as conclusões acerca do efeito bactericida do desinfectante testado não são válidas.

Teste XVII

Neste teste utilizaram-se dois neutralizantes: A e B. No entanto, o neutralizante A foi preparado em concentrações mais baixas (A_2 , A_3 e A_4), com o objectivo de se compreender se a elevada concentração do neutralizante seria o problema para o controlo B não ser validado em nenhum teste.

Observando os resultados obtidos verifica-se que as suspensões teste (N_v) e de validação (N_{v0}) foram validadas para *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Como tal, as conclusões retiradas acerca do controlo B são válidas.

De acordo com os resultados da tabela “Controlo do neutralizante (B)”, verifica-se que nenhum dos ensaios foi validado. Desta forma, conclui-se que a toxicidade do neutralizante A não está relacionada com a sua composição química, uma vez que foram utilizadas diluições do neutralizante e os valores V_c do controlo B continuaram a estar abaixo do limite permitido, indicando que houve uma elevada redução bacteriana.

Discussão geral dos resultados

Os resultados dos vários testes mostram que o densimat® é um aparelho capaz de efectuar um bom ajuste do número de células bacterianas, revelando-se um método válido, rápido e fácil de usar. Para além disso, a sua reprodutibilidade também foi demonstrada para as várias estirpes usadas: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. fecalis*, *S. Typhimurium* e *L. monocytogenes*.

Antes de se efectuar o teste bactericida, é sempre necessário encontrar o neutralizante mais adequado ao desinfectante que se vai testar, não podendo este ser tóxico para nenhuma das bactérias. De acordo com os resultados obtidos, o neutralizante mais adequado para desinfectantes cujo princípio activo são tensioactivos aniónicos (desinfectante I) é a gema de ovo diluída 5% (neutralizante B) e o neutralizante mais adequado para desinfectantes cujo princípio activo sejam alcalis inorgânicos (desinfectante II) é o tampão fosfato 0,25 mol/l (neutralizante A_1).

Para o desinfetante cujo princípio activo é o cloreto de benzalcónio (desinfetante III) e hidrocloreto biguanida polimérica, álcool etoxilado e cloreto de benzalcónio (desinfetante IV), nenhum dos neutralizantes testados se revelou adequado. Assim, seria importante testar outros neutralizantes eficazes na neutralização dos desinfetantes III e IV, e que não sejam tóxicos para nenhuma das estirpes bacterianas usadas nos testes bactericidas.

O método implementado para estudar a actividade bactericida de desinfetantes químicos revelou-se um método válido para as bactérias obrigatórias mencionadas na norma EN1040 (*S. aureus* e *P. aeruginosa*). Para além destas bactérias, o método também se mostrou sensível às outras bactérias testadas, nomeadamente *E. coli*, *S. Typhimurium*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes*. Como tal, a introdução de *L. monocytogenes* na norma EN1040 seria viável e de extrema importância, tendo em conta o interesse desta bactéria no contexto alimentar e o aumento do número de surtos graves, nos últimos anos, provocados por esta bactéria.

O método implementado revelou ser um bom método para avaliar a eficácia bactericida de desinfetantes pois, com os resultados obtidos, é possível determinar as concentrações de uso aconselhadas para cada desinfetante, tendo em conta o grau de resistência de cada estirpe bacteriana. Isto porque a sensibilidade da técnica permite obter resultados diferentes na eficácia do efeito bactericida do desinfetante, se a sua concentração variar apenas 2 %.

Para se assegurar a reprodutibilidade do método, será necessário, numa próxima abordagem, efectuar a repetição exaustiva de todos os testes realizados para cada desinfetante e estirpe bacteriana, seguida de análise estatística para a validação do método.

VI. CONCLUSÃO

Relevância dos objectivos do trabalho

Concluiu-se que em Portugal não estava implementado, com vista à acreditação pelo Organismo Nacional de Acreditação (IPAC), em nenhum laboratório, um método que permita testar a actividade bactericida de desinfectantes químicos segundo a Norma Europeia EN 1040 – Desinfectantes Químicos e Antisépticos - Teste de suspensão Quantitativa para avaliação da actividade bactericida básica de desinfectantes químicos e antisépticos- Métodos e requisitos (Fase 1) . Concluiu-se ainda que a certificação de desinfectantes deve ser um requisito essencial para o sistema de implementação de HACCP, mas que tal está condicionado à existência de laboratórios acreditados para os ensaios descritos na EN 1040. O presente trabalho é uma contribuição para estes pressupostos.

Desenvolvimento do método de diluição neutralização (EN 1040)

Constatou-se que os procedimentos descritos na EN 1040 deveriam ser aperfeiçoados de forma a incluir outras estirpes bacterianas importantes no contexto alimentar e que têm sido causadores de surtos alimentares graves nos últimos anos, como é o caso de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*.

Constatou-se também que o facto de os ensaios serem realizados num laboratório de microbiologia dos alimentos reunia as condições adequadas para a realização das boas práticas laboratoriais, evitando contaminações de origem química passivas de falsos resultados negativos.

A selecção e escolha dos desinfectantes com base no seu princípio activo permitiu testar uma gama alargada de compostos biocidas dando uma boa representatividade dos desinfectantes mais utilizados no contexto alimentar.

Caracterização do poder de eficácia dos desinfectantes utilizados

Com este trabalho foi possível concluir que o aparelho Densimat (bioMérieux) é um método rápido, preciso e eficaz para avaliar a densidade celular das diferentes bactérias testadas, devendo o intervalo de leituras situar-se entre os 0,8 e 2,6 na escala de McFarland.

Foi possível concluir que o método implementado para testar a actividade bactericida de desinfectantes químicos é sensível e válido para todas as bactérias testadas: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. Typhimurium*, *E. faecalis* e *L. monocytogenes*.

Conclui-se também que, antes de se efectuar o teste bactericida, é sempre necessário encontrar o neutralizante mais adequado ao desinfectante que se vai testar, não podendo este ser tóxico para nenhuma das bactérias.

O neutralizante mais adequado para desinfectantes cujo princípio activo são tensioactivos aniónicos é a gema de ovo diluída 5% e o neutralizante mais adequado para desinfectantes cujo princípio activo sejam alcalis inorgânicos é o tampão fosfato 0,25 mol/l. Para o desinfectante cujo princípio activo é o cloreto de benzalcónio para o desinfectante contendo hidrocloreto biguanida polimérica, álcool etoxilado e cloreto de benzalcónio, nenhum dos neutralizantes testados se revelou adequado.

A validação do controlo A e C foi conseguida, porém, não se conseguiu validar o controlo B em nenhum dos testes efectuados.

Conclui-se, ainda, que o método implementado é sensível à concentração de desinfectante que é utilizada para efectuar o teste e é um método reprodutível, se efectuado nas mesmas condições experimentais.

Perspectivas futuras

O presente trabalho, enquadrado numa perspectiva de investigação pré e pós normativa, permite concluir que a norma EN1040, apesar de adequada, deverá ser revista para incluir outras estirpes bacterianas cujo potencial de patogenicidade é elevado e relevante para a saúde pública, como é o caso de *L. monocytogenes*.

Neste contexto, deverá ser feito um estudo mais abrangente, de forma a incluir a selecção de um maior número de neutralizantes, com o objectivo de se encontrarem neutralizantes que não sejam tóxicos para as estirpes testadas.

Em virtude do presente trabalho consubstanciar a metodologia e os requisitos técnicos para a acreditação do ensaio, deverá ser agora iniciado o processo de reconhecimento da competência técnica por terceiros reunida na Norma 17025 com o objectivo da obtenção da acreditação pelo IPAC para a realização de ensaios de certificação da actividade bactericida de desinfectantes para uso alimentar.

VII. BIBLIOGRAFIA

- ALLERBERGER, F., & WAGNER, M. 2010. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *Clinical Microbiology and Infection* , **16**(1): 16-23.
- ALONSO-HERNANDO, A., ALONSON-CALLEJA, C., & CAPITA, R. 2009. Comparative analysis of acid resistance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* strains before and after exposure to poultry decontaminants. Role of the glutamate decarboxylase (GAD) system. *Food Microbiol.* , **26**(8): 905-909.
- ARAUJO, R., RODRIGUES, A., & PINA-VAZ, C. 2004. A fast, practical and reproducible procedure for the standardization of the cell density of an *Aspergillus* suspension. *J Med Microbiol* , **53**: 783-786.
- BAKER, K., HEGARTY, J., REDMOND, B., REED, N., & HERSON, D. 2002. Effect of Oxidizing Disinfectants (Chlorine, Monochloramine and Ozone) on *Helicobacter pylori*. *Applied and Environmental Microbiology* , **68**(2): 981-984.
- BAPTISTA, P. 2003. *Higienização de equipamentos e instalações na indústria agro-alimentar*. Guimarães: Forvisão.
- CALLAWAY, T., ANDERSON, R., EDRINGTON, T., GENOVESE, K., BISCHOFF, K., POOLE, T., et al. 2004. What are we doing about *Escherichia coli* O157:H7 in cattle? *J Anim. Sci.* , **82**: E93-E99.
- CERF, O., CARPENTIER, B., & SANDERS, P. 2010. Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: "Resistance" has different meanings. *International Journal of Food Microbiology* , **136**(3): 247-254.
- COSSART, P. 2007. Listeriology (1926-2007): the rise of a model pathogen. *Microbes Infect.* , **9**(10): 1143-1146.
- COTTERCHIO, M., GUNN, J., TORNEY, P., & BARRY, M. 1998. Effect of a manager training program on sanitary conditions in restaurants. *Public Health Rep.* , **113**(4): 353-358.
- DAVIDSON, P., & HARRISON, M. 2002. Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls. *Food Technology Magazine* , **56**(11): 69-78.
- DREVETS, D., & BRONZE, M. 2008. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol Med Microbiol.* , **53**(2): 151-165.
- EFSA. 2010. The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *The EFSA Journal* , 1496.
- ESPIGARES, E., BUENO, A., FERNÁNDEZ-CREHUET, M., & ESPIGARES, M. 2003. Efficacy of some neutralizers in suspension tests determining the activity of disinfectants. *Journal of Hospital Infection* , **55**: 137-140.

- FERREIRA, W., & SOUSA, J. 2000. *Microbiologia - Volumes 1 e 2*. Lisboa: Lidel.
- FISHER, K., & PHILLIPS, C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* , **155**: 1749-1757.
- FRANZ, C., STILES, M., SCHLEIFER, K., & HOLZAPFEL, W. 2003. Enterococci in foods - a conundrum for food safety. *Int J Food Microbiol.* , **88**(2-3): 105-122.
- GANDHI, M., & CHIKINDAS, M. 2007. Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology* , **113**(1): 1-15.
- GRACIAS, K., & MCKILLIP, J. 2004. A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Can J Microbiol.* , **50**(11): 883-890.
- HANNING, I., NUTT, J., & RICKE, S. 2009. Salmonellosis outbreaks in the United States due to fresh produce: sources and potential intervention measures. *Foodborne Pathog Dis.* , **6**(6): 635-648.
- HENOUN, N., ZINK, E., GRANDADAM, S., BIENTZ, M., & MEUNIER, O. 2004. Effectiveness of detergent-disinfecting agents on *Escherichia coli* 54127 biofilm. *J Hosp Infect.* , **57**(2): 175-178.
- IBARRA, J., & STEELE-MORTIMER, O. 2009. Salmonella – the ultimate insider. Salmonella virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol.* , **11**(11): 1579-1586.
- JOSEPH, B., OTTA, S., & KARUNASAGAR, I. 2001. Biofilm formation by salmonella spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J Food Microbiol.* , **64**(3): 367-72.
- KARMALI, M., GANNON, V., & SARGEANT, J. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol.* , **140**(3-4): 360-70.
- KAYER, F. 2003. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *International Journal of Food Microbiology* , **88**(2-3): 255-262.
- KIM, H., RYU, J.-H., & BEUCHAT, L. 2007. Effectiveness of Disinfectants in Killing *Enterobacter sakazakii* in Suspension, Dried on the Surface of Stainless Steel, and in a Biofilm. *Applied and Environmental Microbiology* , **73**(4): 1256-1265.
- KLEIN, G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* , **88**(2-3): 123-131.
- KUMAR, C., & ANAND, S. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology* , **42**(1-2): 9-27.
- LAHIRI, A., DAS, P., & CHAKRAVORTTY, D. 2009. Salmonella Typhimurium: insight into the multi-faceted role of the LysR-type transcriptional regulators in Salmonella. *Int J Biochem Cell Biol.* , **41**(11): 2129-2133.
- LAN, R., P., R., & OCTAVIA, S. 2009. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. *Infect Genet Evol*, **9**(5): 996-1005.
- LE LOIR, Y., BARON, F., & GAUTIER, M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetics and Molecular Research* , **2** (1): 63-76.

- LECUIT, M. 2007. Human listeriosis and animal models. *Microbes and Infection*, **9**(10): 1215-1225.
- LUNGU, B., RICKE, S., & JOHNSON, M. 2009. Growth, survival, proliferation and pathogenesis of *Listeria monocytogenes* under low oxygen or anaerobic conditions: A review. *Anaerobe* , **15**(1-2): 7-17.
- MCDONNELL, G., & RUSSELL, A. 1999. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clin Microbiol Rev.* , **12**(1): 147-179.
- MESAROS, N., NORDMANN, P., PLÉSIAT, P., ROUSSEL-DELVALLEZ, M., ELDERE, J., GLUPCZYNSKI, Y., et al. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millenium. *Clin Microbiol Infect* , **13**: 560-548.
- MEYER, B., MORIN, V., RÖDGER, H., HOLAH, J., & BIRD, C. 2010. Do European Standard Disinfectant tests truly simulate in-use microbial and organic soiling conditions on food preparation surfaces? *J Appl Microbiol.* **180**(4): 1344-51.
- MOHAMED, J., & HUANG, D. 2007. Biofilm formation by enterococci. *J Med Microbiol.* , **56**(12): 1581-1588.
- MOUNIER, M., PESTOURIE, N., PLOY, M.-C., & DENIS, F. 2009. Les détergents et les désinfectants : rôle en médecine (1re partie). *Antibiotiques* , **11**(3): 177-184.
- Norma Europea EN 1040 - Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of basic bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics - Test method and requirements (phase 1)*. 2005. European Standardization Committee.
- PAN, Y., BREIDT JR., F., & KATHARIOU, S. 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment. *Applied and Environmental Microbiology* , **72**(12): 7711-7717.
- PANOS, G., BETSI, G., & FALAGAS, M. 2006. Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection? *Aliment Pharmacol Ther* , **24**: 731-742.
- ROCHA, J. 1999. Aplicações de agentes tensioactivos em biotecnologia. *Boletim de Biotecnologia - Sociedade Portuguesa de Biotecnologia* , Capítulo 5.
- RUSSEL, A. 2002. Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. *J. Antimicrob. Chemother.* , **49**(4): 597-599.
- STENBERG, A., MACDONALD, C., & HUNTER, P. 2008. How effective is good domestic kitchen hygiene at reducing diarrhoeal disease in developed countries? A systematic review and reanalysis of the UK IID study. *BMC Public Health* , **8**: 71.
- VELÁZQUEZ, L., BARBINI, N., ESCUDERO, M., ESTRADA, C., & GUZMÁN, A. 2009. Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables. *Food Control* , **20**(3): 262-268.

- VIEGAS, S. 2010. *Alterações do estado de saúde associadas à alimentação – contaminação microbiológica dos alimentos*. Lisboa: Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.
- WALTON, J., HILL, D., PROTHEROE, R., NEVILL, A., & GIBSON, H. 2008. Investigation into the effect of detergents on disinfectant susceptibility of attached *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* , **105**(1): 309-315.
- WARRINER, K., & NAMVAR, A. 2009. What is the hysteria with *Listeria*? *Trends in food Science & Technology* , **20**(6-7): 245-254.
- WEBER, D., RUTALA, W., & SICKBERT-BENNETT, E. 2007. Outbreaks Associated with Contaminated Antiseptics and Disinfectants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* , **51**(12): 4217-4224.
- WONG, A. 1998. Biofilms in Food Processing Environments. *Journal of Dairy Science* , **81**(10): 2765-2770.
- YETKIN, G., OTLU, B., CICEK, A., KUZUCU, C., & DURMAZ, R. 2006. Clinical, microbiologic, and epidemiologic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. *Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology Inc.* , **34**(4): 188-192.

VIII. ANEXOS

ANEXO A

N e N_v representam as suspensões bacterianas, N_a representa a mistura bacteriana teste, A (controlo das condições experimentais), B (controlo do neutralizante ou filtração), C (método de validação) representam as diferentes misturas teste controlo.

N , N_v , N_0 , N_{v0} , N_a e A , B e C representam o número de células contadas por ml nas diferentes misturas teste, de acordo com a tabela V.

Tabela V – Número de células contadas, por mililitro, nas diferentes misturas teste.

	Nº de células por ml nas suspensões bacterianas	Nº de células por ml nas misturas teste no início do tempo de contagem (tempo = 0)	Nº de sobreviventes por ml nas misturas teste no final do tempo de contacto t ou 5 min (B) ou 30 min (C)
Teste	N Suspensão teste	$N_0 (= N/10)$	N_a (antes da neutralização ou filtração)
Controlos	N_v Suspensão de validação	$N_{v0} (= N_v/10)$	A, B, C

ANEXO B

B. Verificação da Metodologia

O teste é válido se:

- 1) todos os resultados preencherem os critérios “limites básicos” (ver adiante);
- 2) se forem preenchidos os requisitos “controlo das soluções teste do produto activo e não-activo”.

Controlo da média ponderada das contagens

Para os resultados calculados por média ponderada de duas diluições seguidas (ex: N), o quociente da média dos dois resultados não deve ser maior que 15 nem menor que 5.

Limites

Para cada bactéria, é necessário que:

- a) N esteja contido no intervalo $1,5 \times 10^8$ a $5,0 \times 10^8$ ($8,17 \leq \lg N \leq 8,70$)
 N_0 esteja contido no intervalo $1,5 \times 10^7$ a $5,0 \times 10^7$ ($7,17 \leq \lg N_0 \leq 7,70$)

- b) Nv_0 esteja contido no intervalo 30 a 160 ($3,0 \times 10^1$ e $1,6 \times 10^2$)
(Nv esteja contido no intervalo $3,0 \times 10^2$ a $1,6 \times 10^3$)

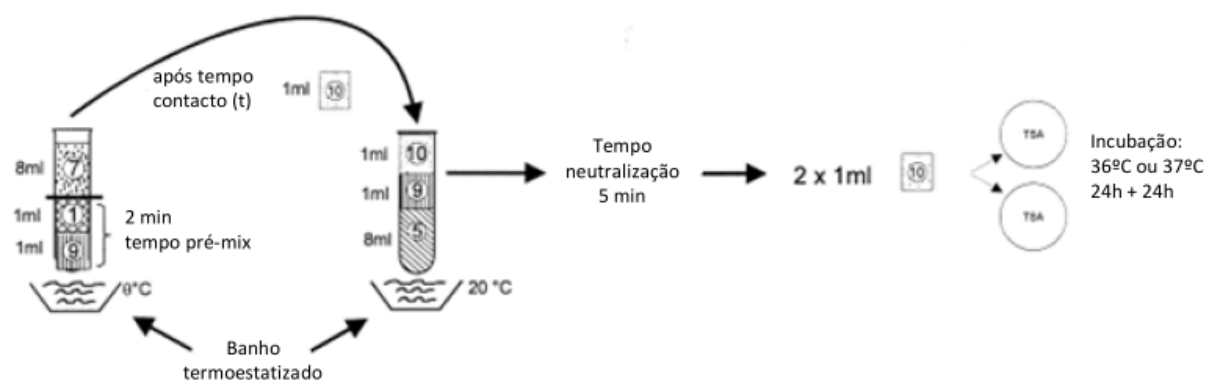
- c) A, B, C tem que ser superior a $0,5 \times Nv_0$

- d) Controlo da média ponderada: quociente > 5 e < 15 .

ANEXO C

C. Representação gráfica dos procedimentos do teste (adaptado da Norma EN1040)

Teste (Na)

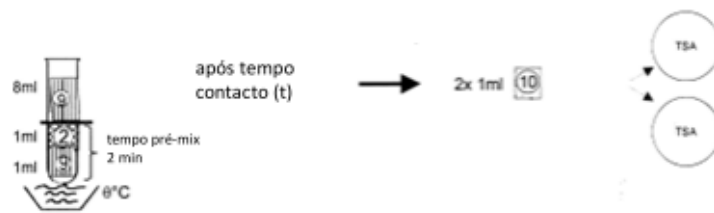


Legenda:

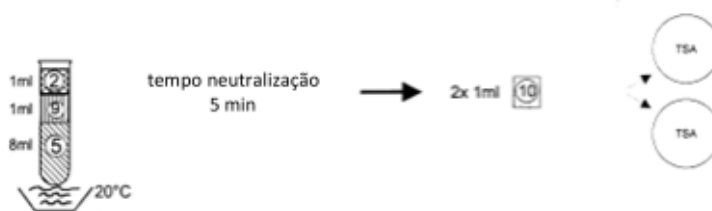
	Suspensão teste (N)		Água
	Neutralizante (20°C)		Mistura
	Solução teste do produto		

Fig. 17: Representação gráfica do método de diluição-neutralização.

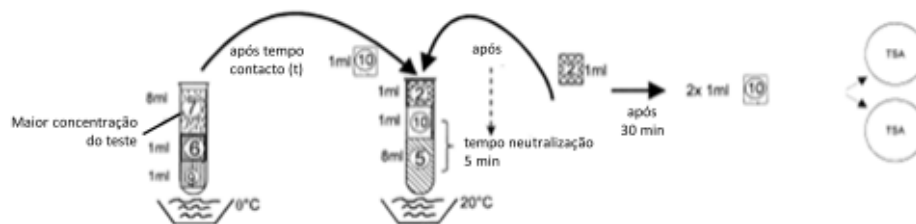
Condições experimentais controlo (A)



Controlo do Neutralizante (B)



Validação do Método (C)



Incubação:
36°C ou 37°C
24h + 24h

Legenda:

	Suspensão Validação (Nv)		Solução teste do produto
	Neutralizante (20°C)		Água
	Diluidor		Mistura

Fig. 18: Representação gráfica dos controlos do método de diluição-neutralização.

ANEXO D

Exemplo de um relatório de teste típico (adaptado da norma EN1040)

Nota 1: Todos os nomes e exemplos no anexo D são fictícios.

Nota 2: Está apresentado como exemplo os resultados de apenas um replicado de *Pseudomonas aeruginosa*.

HHQ Laboratories
Antiseptville/Euroland
Tel. ++011.57 83 62-0
Fax. ++011-57 83 62-19
e-mail: h.h.Q.lab@net.com

RELATÓRIO DE TESTE EN 1040, ACTIVIDADE BACTERICIDA (condições obrigatórias e adicionais)

Cliente: Centipede Formulations INC., Markkleeberg / Euroland

Amostra-desinfetante

Nome do produto: W

Número do lote: 01-05-48

Fabricante: ou - se desconhecido - **fornecedor:** Centipede Formulations Inc. (fabricante)

Condições de armazenagem (temp. e outras): Temperatura ambiente, escuro

Aspecto do produto: Líquido, claro, amarelado

Substância(s) activa(s) e sua(s) concentração(s): Não indicado

Diluidor recomendado pelo fabricante: Água potável

Período de teste

Data da entrega do produto: 2005-05-01
(anexado)

Data dos testes: ver "Resultados do teste"

Condições experimentais

Produto diluidor: água destilada ; **concentração do produto testado:** ver "Resultados teste"
(anexado)

Condições obrigatórias: organismos-teste: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538; temperatura teste: 20 °C; tempo de contacto: 5 min;
Temperatura de incubação: 36 °C

Condições adicionais

Organismo teste: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442;
Temperatura teste: 10 °C; tempo de contacto: 60 min;
Temperatura de incubação: 36 °C
Resultados teste: ver folhas anexadas.

Observações especiais a respeito dos resultados:

Todos os controlos e validação estiveram dentro dos limites básicos.

Pelo menos uma das concentrações do produto demonstrou uma redução inferior a 5 lg.

Não ocorreu precipitação do produto durante os procedimentos do teste (as misturas teste foram homogéneas).

Conclusão:

Para o produto W (lote 01-05-48), a concentração bactericida básica determinada de acordo com a norma EN 1040 (condições obrigatórias) é:

1 % (v/v)

(a redução média dos seis replicados do organismos teste limitante *Pseudomonas aeruginosa* foi de 1.2×10^5 . *Staphylococcus aureus* foi testado uma vez e mostrou uma redução de 5 lg ou mais a uma concentração menor que *Pseudomonas aeruginosa*).

Para o produto W (lote 01-05-48), a concentração bactericida determinada de acordo com a norma EN 1040 a 10 °C, com um tempo de contacto de 60 min, usando *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 como organismo teste, é:

1,5 % (v/v)

O produto W possui actividade bactericida nas condições testadas. Para efeitos de qualificação do produto para um determinado propósito, este deverá ser avaliado de acordo com testes standard adicionais, apropriados para o seu uso.

Antiseptiville, 2005-10-10

Alexandra May, MD, PhD, Directora Científica

Resultados do teste (teste de suspensão bacteriana)

EN....1040.....(Fase 1) Nome do produto:W..... Lote n.º: ..01-05-48.....

Observações:

Método diluição-neutralização ☒

Verter em placa ☐ Espalhar em placa ☒ n.º de placas: 2/ml

Neutralizante: Lecitina 3,0 g/l em diluidor

Método de filtração em membrana Líquido de lavagem:

Temperatura teste: 20 °C

Organismo teste: ...*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442... Temperatura de incubação: 36 °C

N.º lab. Interno: ...QS 68/00 Pessoa responsável: ...Fang..... Assinatura: ...Fang

Data do teste: 2005-05-05

Diluidor usado para as soluções teste do produto: água destilada

Aparência das soluções teste do produto: límpida

Validação e controlos

Suspensão de validação (Nvo)			Controlo das condições experimentais (A)			Controlo do neutralizante ou filtração (B)			Validação do método (C) Conc. Produto: 10 ml/l		
Vc1	86 (40 + 46)	$\bar{x}$ =	Vc1	79 (43 + 36)	$\bar{x}$ =	Vc1	86 (42 + 44)	$\bar{x}$ =	Vc1	75 (35 + 40)	$\bar{x}$ =
Vc2	92 (47 + 45)	89	Vc2	84 (39 + 45)	81,5	Vc2	91 (43 + 48)	88,5	Vc2	87 (41 + 46)	81
30 ≤ $\bar{x}$ de Nvo ≤ 160 ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de A é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nvo ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de B é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nvo ? ☒ sim ☐ não			$\bar{x}$ de C é ≥ 0,5 x $\bar{x}$ de Nvo ? ☒ sim ☐ não		

Suspensão teste e Teste

Suspensão-teste (N e No)	N	Vc1	Vc2	$\bar{x}_{wm} = 193,64 \times 10^6$, lg.N = 8,29 No = N/10 ; lg No = 7,29 7,17 ≤ lg No ≤ 7,70 ? ☒ sim ☐ não
	10 ⁻⁶	168	213	
	10 ⁻⁷	20	25	

Conc. do produto %	Vc1	Vc2	Na = $\bar{x} \times 10$	lgNa	lgR (No=7,29)	Tempo de contacto (min)
0,50	> 660	> 630	> 6450	> 3,81	<3,48	5 min
0,75	122	154	1380	3,14	4,15	5 min
1,00	7	0	< 140	<2,15	>5,14	5 min

Contagens por placa, para:

N 10⁻⁶: 80 + 88; 105 + 108

10⁻⁷: 9 + 11; 15 + 10

Na 0,75 % : 66 + 45; 71 + 83

1,00 % Vc1: 1 + 6

Explicações:

Vc = contagem por ml (uma placa ou mais)

$\bar{x}$ = média de Vc1 e Vc2 (1. + 2. duplicado)

$\bar{x}_{wm}$ = média ponderada de $\bar{x}$

R = redução (lg R = lgN₀ – lgNa)